

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 1997 bis April 2002 in Bayreuth am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. E. Beck und Herrn Dr. P. Ziegler angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Promotionsgesuch eingereicht am 10.04.2002

Wissenschaftliches Kolloquium am 17.10.2002

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. D. Kleiner (Vorsitzender)

Prof. Dr. E. Beck (Erstgutachter)

Prof. Dr. F. X. Schmid (Zweitgutachter)

Prof. Dr. W. Schumann

Prof. Dr. H. Hoffmann

α -Glucan-Phosphorylasen aus Weizen

(*Triticum aestivum* L.)

Isolierung, Charakterisierung und Analyse der
Expression

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Nicole Schupp
aus Mainz

Bayreuth, April 2002

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Tagungen als Poster präsentiert:

Botaniker-Tagung, Bremen, 1998:

Glucan Phosphorylases of Wheat Leaves: Partial Purification and Characterization (Nicole Schupp und Paul Ziegler).

Genetic Tailoring of Novel Starch Polymers – Report of the 1995-1999 Framework IV EU FAIR program, Carry-le-Rouet 1999:

*Involvement of α -1,4-glucan phosphorylases of wheat (*Triticum aestivum* L.) in starch metabolism during seed development and germination* (Nicole Schupp und Paul Ziegler).

Starch 2000 – Structure and Function, Cambridge, 2000:

Involvement of Phosphorylases in Wheat Starch Metabolism (Nicole Schupp und Paul Ziegler).

Botaniker-Tagung, Jena, 2000:

Glucan Phosphorylases of Wheat Leaves: Characterization and Inhibition by β -Amylase (Nicole Schupp, Silke Hübsch und Paul Ziegler).

Glucan Phosphorylases of Wheat Seeds: Involvement in Starch Synthesis during Seed Development (Nicole Schupp, Silke Hübsch und Paul Ziegler).

Forschungsaufenthalt:

John Innes Centre, Norwich, UK (2001), unter der Leitung von Dr. Alison Smith; Schwerpunkt: Charakterisierung einer *Arabidopsis*-Mutante der die Aktivität der plastidischen Phosphorylase fehlt.

INHALT

	INHALT	I
	ABKÜRZUNGEN	IV
I	EINLEITUNG	1
I.1	STÄRKE UND STÄRKEMETABOLISMUS	1
I.2	PFLANZLICHE α-1,4-GLUCAN-PHOSPHORYLASEN	6
I.3	α-1,4-GLUCAN-PHOSPHORYLASEN AUS WEIZEN	9
I.4	ZIELSETZUNG	11
II	MATERIAL UND METHODEN	12
II.1	MATERIAL	12
II.1.1	Pflanzenmaterial	12
II.1.2	Bakterienstämme und Vektoren	12
II.1.3	Oligonukleotidprimer	13
II.1.4	Chemikalien und Verbrauchsmittel	14
II.1.5	Computerprogramme	15
II.2	METHODEN	15
II.2.1	Anzucht und Ernte des Pflanzenmaterials	15
II.2.2	Bakterienanzucht	16
II.2.2.1	Nährmedien	16
II.2.2.2	Über-Nacht-Kultur	16
II.2.2.3	Dauerkulturen	16
II.2.2.4	Kulturen zur heterologen Expression von Phosphorylase-cDNA	17
II.2.2.5	Bestimmung der optischen Dichte von Bakterienkulturen	17
II.2.3	Molekularbiologische Methoden	17
II.2.3.1	Puffer und Lösungen	17
II.2.3.2	Transformation von <i>E. coli</i>	18
II.2.3.2.1	Herstellung kompetenter Zellen	18
II.2.3.2.2	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	18
II.2.3.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	19
II.2.3.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	19
II.2.3.5	Ethanolpräzipitation von DNA	19
II.2.3.6	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	20
II.2.3.7	Agarosegelelektrophorese von DNA und Elution von DNA-Fragmenten	20
II.2.3.8	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	21
II.2.3.9	Ligation von DNA-Fragmenten	21
II.2.3.10	DNA-Sequenzierung	21
II.2.3.11	PCR-Amplifikationen	22
II.2.3.11.1	PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten	22
II.2.3.11.2	PCR zur Einführung von Schnittstellen	22
II.2.3.11.3	PCR zur Amplifizierung von cDNA-Enden ("RACE, rapid amplification of cDNA-ends")	23
II.2.3.12	Isolierung von PolyA ⁺ -RNA aus Weizenblättern	24
II.2.3.13	Reverse Transkription von RNA	25
II.2.3.14	cDNA-Bank-Herstellung und Screening	25
II.2.3.14.1	cDNA-Synthese	25
II.2.3.14.2	Nicht-denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese für DNA	25
II.2.3.14.3	Ligation der cDNA in den Uni-ZAP XR-Vektor und Verpackung in die λ -Phagen	25

II.2.3.14.4	Titerbestimmung, Amplifizierung und Ausplattieren der cDNA-Bank	26
II.2.3.14.5	Screening der cDNA-Bank	27
II.2.3.14.6	<i>In vivo</i> -Excision des Phagemids pBluescript [®] aus λ -Uni-ZAP XR	28
II.2.3.15	Northernblot-Analyse	28
II.2.3.15.1	Isolierung von Gesamt-RNA	28
II.2.3.15.2	Denaturierende Agarosegelelektrophorese von RNA	29
II.2.3.15.3	Transfer von RNA auf Nylonmembranen (Northernblot)	29
II.2.3.15.4	Hybridisierung und Radioautographie	30
II.2.3.15.5	Markierung der DNA-Sonden	30
II.2.4	Proteinchemische Methoden	30
II.2.4.1	Herstellung von Proteinextrakten	30
II.2.4.1.1	Extraktion von Protein aus Weizenblättern	30
II.2.4.1.2	Extraktion von Protein aus Weizenkörnern	31
II.2.4.1.3	Aufschluß von <i>E. coli</i> -Zellen	31
II.2.4.2	Säulenchromatographische Verfahren	31
II.2.4.2.1	Affinitätschromatographie an Cycloheptaamylose	31
II.2.4.2.2	Rechromatographie an Cycloheptaamylose	32
II.2.4.2.3	Chromatographien zur Reinigung der plastidischen Phosphorylase	32
II.2.4.3	Entsalzung, Konzentrierung und Lagerung von Proben	34
II.2.4.4	Polyacrylamidgelelektrophoresen (PAGE)	34
II.2.4.4.1	Analytische PAGE zum Nachweis von Phosphorylaseaktivität	34
II.2.4.4.2	Denaturierende PAGE	35
II.2.4.4.3	Isoelektrische Fokussierung	37
II.2.4.5	Westernblot	38
II.2.5	Analytische Methoden	39
II.2.5.1	Proteinanalytik	39
II.2.5.1.1	Proteinbestimmung	39
II.2.5.1.2	Proteinspaltung	39
II.2.5.1.3	Sequenzierung des N-Terminus	40
II.2.5.2	Bestimmung von Enzymaktivitäten	40
II.2.5.2.1	Bestimmung der abbauenden Aktivität der Phosphorylase	40
II.2.5.2.2	Messung der synthetisierenden Aktivität der Phosphorylase	43
II.2.5.3	Bestimmung von Kohlenhydraten	44
II.2.6	Immunologische Methoden	45
II.2.6.1	Antikörperherstellung	45
II.2.6.2	Immunnachweis der Phosphorylase nach Westernblotting	45
II.2.6.3	Kolonieblot	46
III	ERGEBNISSE	48
III.1	REINIGUNG DER PHOSPHORYLASEPROTEINE AUS WEIZENBLÄTTERN	48
III.1.1	Reinigung der cytosolischen Phosphorylasen	48
III.1.1.1	Isolierung von zwei Proteinen durch Affinitätschromatographie an Cycloheptaamylose-Sepharose	48
III.1.1.2	Trennung des 90 kD- und des 100 kD-Proteins	51
III.1.1.3	Ist das 100 kD-Protein eine Phosphorylase?	54
III.1.1.4	Bilanz der Reinigung der cytosolischen Phosphorylase	57
III.1.2	Reinigung der plastidischen Phosphorylase	58
III.2	CHARAKTERISIERUNG DER CYTOSOLISCHEN PHOSPHORYLASE AUS WEIZENBLÄTTERN	60
III.2.1	Molekulargewichtsbestimmung	61
III.2.2	Aktivität in Abhängigkeit vom Substrat	61
III.2.3	Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert	64

III.2.4	Einfluss von Thiolen	65
III.2.5	Einfluss des 100 kD-Proteins auf die cytosolische Phosphorylase	65
III.3	GEWINNUNG VON ANTIKÖRPERN GEGEN DIE CYTOSOLISCHE PHOSPHORYLASE	65
III.4	ISOLIERUNG VON cDNAs VON PHOSPHORYLASEGENEN	68
III.4.1	Konstruktion einer Phosphorylasesonde	68
III.4.2	cDNA-Bank-Herstellung und Isolierung von Phosphorylaseklonen	70
III.4.3	Die cytosolische Phosphorylase	71
III.4.4	Untersuchung des 5'-Endes der Sequenz der cytosolischen Phosphorylase	72
III.4.5	Die plastidische Phosphorylase	74
III.5	AKTIVITÄTS-UND EXPRESSIONSANALYSEN	81
III.5.1	Abhängigkeit der Phosphorylaseaktivität vom Blattalter	81
III.5.2	Tagesgang der Phosphorylaseaktivität im Blatt	82
III.5.3	Aktivität und Expression der Phosphorylasen während der Keimung	82
III.5.4	Aktivität und Expression der Phosphorylasen während der Kornentwicklung	84
IV	DISKUSSION	89
IV.1	REINIGUNG	89
IV.1.1	Die cytosolische Phosphorylase	89
IV.1.2	Die plastidische Phosphorylase	94
IV.2	CHARAKTERISIERUNG DER GEREINIGTEN CYTOSOLISCHEN PHOSPHORYLASE	96
IV.2.1	Charakterisierung des Proteins	96
IV.2.2	Charakterisierung der Aktivität der cytosolischen Phosphorylase	98
IV.3	ANTI KÖRPER	102
IV.4	ISOLIERUNG VON cDNAs VON PHOSPHORYLASEGENEN	103
IV.4.1	cDNAs cytosolischer Phosphorylasen	103
IV.4.2	cDNAs plastidischer Phosphorylasen	106
IV.5	AKTIVITÄT UND EXPRESSION	110
IV.5.1	Aktivität und Expression der cytosolischen Phosphorylase	110
IV.5.2	Aktivität und Expression der plastidischen Phosphorylase	113
V	ZUSAMMENFASSUNG	117
VI	SUMMARY	119
VII	LITERATURVERZEICHNIS	121
IX	ANHANG	132
IX.1	HETEROLOGE EXPRESSION DER CYTOSOLISCHEN PHOSPHORYLASE	132
IX.2	PHOSPHORYLASESEQUENZEN AUS WEIZEN STAR	135

ABKÜRZUNGEN

A. bidest	zweifach destilliertes Wasser
A ₂₆₀	Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm
ADP	Adenosin-diphosphat
AGPase	Adenosin-diphosphat-Glucose Pyrophosphorylase
AMP	Adenosin-monophosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-triphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BNPS-Skatol	2-(2'-Nitrophenylsulfenyl)-3-methyl-3'-bromoindolenin
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	<i>engl.</i> bovine serum albumin
BTP	1,3-Bis-[tris-(hydroxymethyl)-methylamino]-propan
cDNA	<i>engl.</i> complementary deoxyribonucleic acid
Ci	Curie
cpm	<i>engl.</i> counts per minute
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	N,N'-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
FPLC	<i>engl.</i> fast protein liquid chromatography
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (9,81 m*s ⁻²)
G1,6P ₂	Glucose-1,6-bisphosphat
G1P	Glucose-1-Phosphat
G6P	Glucose-6-Phosphat
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperatin-N'-(2-ethansulfonsäure)
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
lacZ	Gen für die β-Galactosidase
LB	Luria-Bertani
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
mRNA	<i>engl.</i> messenger RNA (Boten-RNA)
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-phosphat
NBT	Nitrobluetetrazolium
NTCB	2-Nitro-5-thiocyanonenzoesäure
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600
P1	cytosolische Phosphorylase 1 aus Weizen
P2	cytosolische Phosphorylase 2 aus Weizen
P3	plastidische Phosphorylase aus Weizen
P30	mit 30 % PEG konzentrierter Weizenrohextrakt
p.a	per analysis
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PCR	<i>engl.</i> polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol

pfu	<i>engl.</i> plaque forming unit (Plaques-bildende Einheit)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Pho1	Pflanzlicher Phosphorylasetyp 1 (plastidisch)
Pho2	Pflanzlicher Phosphorylasetyp 2 (cytosolisch)
pI	isoelektrischer Punkt
PolyA ⁺ -RNA	polyadenylierte Ribonukleinsäure
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RACE	<i>engl.</i> rapid amplification of cDNA ends
RE	Rohextrakt aus Weizen
rpm	<i>engl.</i> rotations/revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RubisCO	Ribulose-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
SDS	<i>engl.</i> sodium dodecyl sulfate
TAE	Tris/Acetate/EDTA
TBS	<i>engl.</i> tris buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TritonX-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
U	Unit
üN	über Nacht
vgl.	vergleiche
v/v	<i>engl.</i> volume per volume (Volumengehalt)
w/v	<i>engl.</i> weight per volume (Gewichtsprozent)
X-Gal	5-Brom-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid

Aminosäuresymbole

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
*	End	Termination

Nukleotidsymbole

A	Adenin
B	Cytosin, Guanin oder Thymin
C	Cytosin
G	Guanin
H	Adenin, Cytosin oder Thymin
M	Adenin oder Cytosin
N	Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin
R	Adenin oder Guanin
T	Thymin
V	Adenin, Cytosin oder Guanin
W	Adenin oder Thymin
Y	Cytosin oder Thymin

Phosphorylaseklone:

<i>cb</i>	<i>kV</i> nach Verlängerung des 5'-Endes in 5'-Richtung durch RACE
<i>ck1</i>	RACE-Fragment einer cytosolischen Phosphorylase aus Korn-RNA
<i>cKorn</i>	PCR-Fragment einer cytosolischen Phosphorylase aus Korn-RNA
<i>kI</i>	aus der Blatt-cDNA-Bank isoliertes unvollständiges Gen einer cytosolischen Phosphorylase
<i>kV</i>	aus der Blatt-cDNA-Bank isoliertes fast vollständiges Gen einer cytosolischen Phosphorylase
<i>kXXI</i>	aus der Blatt-cDNA-Bank isoliertes fast vollständiges Gen einer cytosolischen Phosphorylase
<i>pb2</i>	RACE-Fragment der plastidischen Phosphorylase 2 aus Blatt-RNA
<i>pb3</i>	RACE-Fragment der plastidischen Phosphorylase 3 aus Blatt-RNA
<i>pBlatt</i>	PCR-Fragment einer plastidischen Phosphorylase aus Blatt-RNA
<i>pk1</i>	RACE-Fragment der plastidischen Phosphorylase 1 aus Korn-RNA
<i>pk2</i>	RACE-Fragment der plastidischen Phosphorylase 2 aus Korn-RNA
<i>pKorn</i>	PCR-Fragment einer plastidischen Phosphorylase aus Korn-RNA
<i>s10</i>	aus der Endosperm-cDNA-Bank isoliertes unvollständiges Gen einer plastidischen Phosphorylase
<i>s13</i>	aus der Endosperm-cDNA-Bank isoliertes unvollständiges Gen einer plastidischen Phosphorylase
<i>s14</i>	aus der Endosperm-cDNA-Bank isoliertes unvollständiges Gen einer plastidischen Phosphorylase
<i>t_aes_cyt</i>	PCR-Fragment der PCR mit degenerierten Primern einer cytosolischen Phosphorylase aus Blatt-RNA
	Bezeichnung der für alle Phosphorylasen spezifischen Sonde

Bezeichnungen von Nukleinsäuresequenzen sind mit kleinen Buchstaben und kursiv gekennzeichnet, die der von ihnen abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit großen Buchstaben und aufrechter Schrift.

I EINLEITUNG

α -Glucan-Phosphorylasen (EC 2.4.1.1) katalysieren den reversiblen Transfer einer Glucosyleinheit vom nicht-reduzierenden Ende eines α -1,4-Oligo- oder Polyglucans auf Orthophosphat, wobei Glucose-1-Phosphat (G1P) gebildet wird. Das Gleichgewicht der Reaktion liegt auf der Seite der Synthese. Welche Reaktion das Enzym *in vivo* im jeweiligen Organismus ausführt, ist nicht in allen Fällen geklärt. In Säugetieren z. B. spielen Phosphorylasen eine zentrale Rolle in der Mobilisierung von Reservepolysacchariden. Phosphorylasen scheinen ubiquitäre Enzyme zu sein, die in vielen Organismen, einschließlich Bakterien, Hefen, Pflanzen und Vertebraten, gefunden wurden. Alle bekannten α -Glucan-Phosphorylasen benötigen Pyridoxal-5-Phosphat für ihre Aktivität. Bei der Reaktion wird jedoch nicht wie bei anderen Pyridoxal-5-Phosphat enthaltenden Enzymen die Schiff'sche Base benötigt. Der Mechanismus der Reaktion beruht vielmehr auf einem Protonenaustausch zwischen der Cofaktor-Phosphatgruppe und dem Orthophosphat oder dem Phosphat von G1P und nachfolgender Spaltung bzw. Bildung der Glucosylbindung (WATSON et al. 1999, PALM et al. 1990). Obwohl der katalytische Mechanismus in allen bekannten Phosphorylasen gleich zu sein scheint, unterscheiden sich Enzyme aus verschiedenen Organismen sehr in ihrer Substratspezifität und Regulation. Die tierischen Phosphorylasen sind sehr gut charakterisiert. Sie bilden Dimere aus zwei identischen Untereinheiten und katalysieren den kontrollierenden Schritt im Glycogenabbau (VOET & VOET 1992). Die Aktivität der Glycogen-Phosphorylase wird durch allosterische Wechselwirkungen und kovalente Modifikation reguliert (JENKINS et al. 1981). Glucan-Phosphorylasen aus Bakterien und Pflanzen sind bisher nicht so gut erforscht wie die tierischen Enzyme (SCHINZEL & NIDETZKY 1999). Vor allem die Funktion der Phosphorylasen im pflanzlichen Stärkemetabolismus wirft noch viele Fragen auf.

I.1 STÄRKE UND STÄRKEMETABOLISMUS

Stärke ist unter den Speicherkohlenhydraten aufgrund ihres mengenmäßigen Vorkommens und ihrer Verbreitung im Pflanzenreich von vorherrschender Bedeutung. Sie ist ein Hauptnahrungsmittel der Weltbevölkerung und wird in der Nahrungs-, Papier- und Textilindustrie verwendet (SLATTERY et al. 2000). Jährlich werden allein für industrielle Anwendungen 20 bis 30 Millionen Tonnen Stärke aus Pflanzen isoliert und verbraucht (HEYER et al. 1999). Die noch ausstehende vollständige Aufklärung des Stärkemetabolismus in Pflanzen ist daher nicht nur ein wissenschaftliches Problem sondern von globaler und kommerzieller Bedeutung.

Stärke kommt in photosynthetischen und nicht-photosynthetischen Pflanzengewebe vor. Im Stroma der Chloroplasten akkumuliert im Laufe des Tages die transitorische Stärke, deren Synthese direkt aus den Primärprodukten der Photosynthese erfolgt. Während der Dunkelphase findet ein weitgehender Abbau dieses kurzfristigen Stärkespeichers für Wachstums- und Atmungsvorgänge statt. Die in den Amyloplasten nicht-grüner Pflanzenteile gebildete Reservestärke dient als Langzeitspeicher. Sie wird mobilisiert, um für Prozesse wie z. B. Keimung, Blüte oder Frühljahrsaustrieb die nötige Energie und den Kohlenstoff bereitzustellen. Transitorische und Reservestärke können aufgrund ihrer physikalischen Charakteristika unterschieden werden. Stärkekörner der transitorischen Stärke sind kleiner als die der Reservestärke und bestehen fast ausschließlich aus dem verzweigten Glucosepolymer Amylopektin (SLATTERY et al. 2000). Die größeren Reservestärkekörner enthalten neben Amylopektin 20 bis 30 % des fast unverzweigten Polymers Amylose (MÜLLER-RÖBER & KOßMANN 1994).

Die zwei Glucosepolymere der Reservestärke, Amylose und Amylopektin, bestehen aus den gleichen Grundbausteinen, unterscheiden sich jedoch in ihrer Länge und ihrem Verzweigungsgrad. Amylose besteht aus α -1,4-glycosidisch verknüpften Glucoseketten, die zu einer Helix aufgewunden sind, ca. 0,1 % α -1,6-glycosidische Bindungen enthalten und ein Molekulargewicht von 10^2 bis 10^3 kD erreichen (HEYER et al. 1999). Amylopektin ist aus kurzen Amyloseketten aufgebaut, die aus 12 bis 60 Glucoseeinheiten, mit einem Mittelwert von 20 Glucoseeinheiten, bestehen. Diese sind α -1,6-glycosidisch zu einer verzweigten Struktur mit einem Molekulargewicht von 10^4 bis 10^6 kD verbunden (KAINUMA 1988). In Stärkekörnern, deren Größe von unter 1 μ m bis über 100 μ m variieren kann, sind die Amylopektinmoleküle radial angeordnet (MARTIN & SMITH 1995). Die Länge der Seitenketten des Amylopektins und ihr Auftreten in Clustern erlaubt die Bildung von Helices im Stärkekorn, die Grundlage der semikristallinen Natur des Korns sind (JENKINS et al. 1993). Inzwischen wird angenommen, dass die Entstehung der semikristallinen Struktur von Stärkekörnern durch Selbstorganisation des Amylopektins aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften erfolgt und nicht aufgrund der Einwirkung der synthetisierenden Enzyme (SMITH 1999). Stärke birgt gegenüber dem von Prokaryoten als Speicherpolysaccharid gebildeten Glycogen den Vorteil, dass ihre makrogranulare Struktur unendlich wachsen kann, während Glycogenpartikel aufgrund sterischer Behinderung durch ihren hohen Verzweigungsgrad nur ein Molekulargewicht von 10^4 kD und 25 nm Durchmesser erreichen können (BALL et al. 1996). So kann in Form der Stärkekörner eine sehr große Menge des in der Photosynthese fixierten Kohlenstoffs gespeichert werden (MYERS et al. 2000).

Weder der Ablauf des Abbaus noch der Synthese von Stärkekörnern ist bis heute umfassend aufgeklärt. Viele der beteiligten Enzyme kommen in mehreren Isoformen

oder als multiple Formen vor, wobei erstere von verschiedenen Genen codiert werden und letztere durch posttranslationale Modifikation entstehen (BECK & ZIEGLER 1989). Viele Enzyme des Stärkeabbaus, wie Amylasen, Phosphorylasen, das R-Enzym und das D-(Disproportionating)Enzym kommen nicht wie erwartet nur in Plastiden vor, sondern auch oder sogar mit ihrer Hauptaktivität im Cytosol (OKITA et al. 1979). Über deren Aufgabe in einem Kompartiment der Zelle, in dem keine Stärke vorhanden ist, kann bisher nur spekuliert werden. In Spinat und Erbse konnte im Cytosol von Blattzellen ein hochmolekulares Heteropolysaccharid nachgewiesen werden (YANG & STEUP 1990 und STEUP et al. 1991). Dieses könnte den cytosolischen Enzymen als Substrat dienen. Das Auftreten des Glucans erklärt jedoch nicht die hohen extraplastidären Enzymaktivitäten, denn es stellt nur 1 % des Gesamtzuckergehaltes des Blattes (YANG & STEUP 1990). Es ist noch nicht bei allen existierenden Enzymformen klar, welche Funktion sie ausüben und ob sie im Stärkemetabolismus tatsächlich benötigt werden, denn das Fehlen mancher Enzyme in Mutanten oder Transformanten hatte auf den Stärkemetabolismus keine Auswirkung. Dies war bei einer Stärkesynthese der Fall (Stärkesynthese II, ABEL et al. 1996) und bei dem D-Enzym (TAKAHA et al. 1998).

Lange wurden α -Amylasen, die als Endoamylasen interne α -1,4-Bindungen in Amylose und Amylopektin spalten, alleine für die Initiation des Stärkeabbaus verantwortlich gemacht (BECK & ZIEGLER 1989), bis festgestellt wurde, dass auch andere Enzyme Stärkekörner angreifen können. Dies sind zum einen α -Glucosidasen, die ohne die Beteiligung anderer Enzyme Stärkekörner vollkommen zu Glucose abbauen können (SUN & HENSON 1990). Eine β -Amylase aus Süßkartoffelknollen kann ebenfalls Stärke hydrolysieren (BABA & KAINUMA 1987). Desweiteren verfügen cytosolische α -Glucan-Phosphorylasen einiger Pflanzen (Spinat: STEUP et al. 1983, Erbse: KRUGER & AP REES 1983 und Pappel: WITT & SAUTER 1995b) über die Fähigkeit, Stärkekörner direkt angreifen zu können. Dies ist vor allem im Falle der Erbse interessant, da in den Keimblättern die Plastidmembranen nicht mehr intakt sind und die cytosolische Phosphorylase somit Zugang zu den Stärkekörnern hat (STEUP 1988). Es erscheint paradox, dass die mit den Stärkekörnern kompartimentierte Phosphorylase diese, im Gegensatz zu dem cytosolischen Enzym, ohne vorherige amylytische Einwirkung nicht abbauen kann (CHANG 1982).

Der weitere Abbau der Stärke ist recht gut erforscht. Je nach Gewebe und Pflanze sind hauptsächlich hydrolytische oder phosphorolytische Enzyme beteiligt. So wird angenommen, dass die Stärke im Endosperm von Getreidekörnern bei der Keimung ausschließlich amylytisch durch α - und β -Amylasen abgebaut wird (BECK & ZIEGLER 1989). Die Notwendigkeit der Beteiligung der β -Amylase, einer Exoamylase, die Maltoseeinheiten vom nicht-reduzierenden Ende einer Glucosekette bis zum Auftreten einer α -1,6-Bindung abspaltet, ist nicht ganz geklärt. Denn Mutanten, de-

nen die β -Amylase fehlt, keimen ebenso gut wie die Wildtyp-Pflanzen (ZIEGLER 1995). Der Abbau der Reservestärke in Kartoffelknollen ist im Gegensatz zu den Getreiden vorrangig phosphorolytisch (MORRELL & AP REES 1986, STEUP 1988), genauso wie der Abbau der transitorischen Stärke in Erbsenchloroplasten (STEUP & LATZKO 1979, PREISS 1982). In Spinatchloroplasten wird die Stärke koordiniert amylolytisch und phosphorolytisch degradiert (OKITA et al 1979, BECK & ZIEGLER 1989).

Die α -1,6-Bindungen des Amylopektins werden von *Debranching Enzymen* wie dem R-Enzym hydrolysiert. Die bei den Reaktionen dieses und anderer Stärke-abbauender Enzyme anfallenden Oligosaccharide werden von dem *D-Enzym*, einer Transferase, zu längeren Glucanen verknüpft (STEUP 1990). So sind sie für den Angriff anderer Enzyme wie der α -Glucan-Phosphorylase, die eine Mindestlänge des Glucans von fünf Glucosemolekülen zur Abspaltung benötigt, wieder zugänglich. Die vollständige Umwandlung von Oligoglucanen und Maltose in Glucose bzw. G1P wird durch das Einwirken entweder der α -Glucosidase oder der Maltosephosphorylase erreicht (PREISS & LEVI 1980). Phosphorylasen heben sich von den hydrolytischen Enzymen durch die Bildung von G1P ab. Dieser phosphorylierte Zucker ist energiereicher als Glucose und bildet die direkte Ausgangsverbindung sowohl für die Dissimilation als auch für mehrere Synthesewege ohne vorher phosphoryliert werden zu müssen.

Der allgemein akzeptierte erste Schritt der Stärkesynthese ist die Bildung von ADP-Glucose aus ATP und G1P durch die *ADP-Glucose-Pyrophosphorylase* (AGPase; PREISS 1988). Die Glucose der ADP-Glucose wird von *Stärkesynthasen* auf das nicht-reduzierende Ende eines linearen α -1,4-Glucanprimers transferiert. Mindestens vier Isoenzyme der Stärkesynthase sind bekannt, von denen drei für die Bildung von Amylopektin und eines, die Stärkekorn-gebundene Stärkesynthase, für die Amylose-synthese im Korn verantwortlich ist (VAN DE WAL et al. 1998). Die Natur des Primers *in vivo* und die Art der Initiation der Stärkesynthese sind bisher unbekannt. Für eine Stärkesynthase aus Mais wurde die Fähigkeit der Polyglucan-Synthese ohne Primer berichtet (OZBUN et al. 1971). Die Initiation der Glycogensynthese in Tieren benötigt ein selbst-glucosylierendes Protein, Glycogenin, von welchem die Glycogensynthase die Kettenverlängerung beginnen kann (SMYTHE & COHEN 1991). In Pflanzen konnte auch ein selbst-glucosylierendes Protein identifiziert werden, jedoch liegen bisher noch keine schlüssigen Beweise für dessen Beteiligung bei der Initiation der Stärkesynthese vor (BOCCA et al. 1997).

Auch die α -Glucan-Phosphorylase ist, wie die Stärkesynthase, in der Lage die Polymerisation von Glucanketten zu katalysieren, mit G1P als Substrat und einem Glucanprimer, obwohl auch hier für ein Enzym beschrieben wurde, dass der Primer nicht notwendig sei (ALBRECHT et al. 2001). Ihr wurde vor der Entdeckung der Stärke-

synthase die Rolle als Hauptenzym der Stärkesynthese zugesprochen und manche Autoren sind auch heute noch dieser Ansicht (TSAI & NELSON 1969 bzw. ERLANDER 1998). Dies ist nach allgemeiner Auffassung sehr unwahrscheinlich, da zum einen die AGPase eine wesentlich höhere Affinität zu G1P hat als die Phosphorylase, letztere demnach wenig Substrat für die Synthese zur Verfügung hätte (PREISS 1988). Zum anderen wurde berichtet, dass die Phosphatkonzentration in der Zelle die Konzentration an G1P bei weitem übertrifft, so dass die phosphorolytische Reaktion begünstigt wäre (PREISS & LEVI 1980, PREISS 1988). Allerdings wurde in isolierten Weizen-Amyloplasten eine Phosphatkonzentration von 1,5 mM und eine G1P-Konzentration von 14,9 mM während der Stärkesynthese gemessen, wodurch dieses Argument geschwächt wäre (TETLOW et al. 1998). Darüberhinaus wird die AGPase schon durch Phosphatkonzentrationen von 1 mM inhibiert (PREISS 1988).

Die Verzweigungen in den Glucanpolymeren werden von *Branching Enzymen* erzeugt. Sie katalysieren die Hydrolyse einer α -1,4-Bindung und die nachfolgende Bildung einer α -1,6-Bindung zwischen dem nicht-reduzierenden Ende der gespaltenen Kette und der Hydroxylgruppe an Position 6 einer Glucosylgruppe eines α -1,4-Glucans (SLATTERY 2000). Jüngste Untersuchungen sprechen auch für eine Beteiligung von *Debranching Enzymen*, also α -1,6-Bindungen spaltenden Enzymen, an der Biosynthese des Amylopektins (BALL et al. 1996). Mutanten aus Mais, Reis, *Chlamydomonas* und Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*), denen eine Debranching Enzym-Aktivität fehlt, akkumulieren neben Amylopektin ein stärker verzweigtes, lösliches Glucan, welches Phytoglycogen oder Prä-Amylopektin genannt wird (JAMES et al. 1995, NAKAMURA et al. 1996, MOUILLE et al. 1996 bzw. ZEEMAN et al. 1998). Aufgrund dieser Befunde wurden zwei Modelle der Amylopektinsynthese erstellt. BALL et al. (1996) nehmen an, dass von der Stärkesynthese und dem Branching Enzym ein hoch-verzweigtes Glucan (Prä-Amylopektin) synthetisiert wird, das an der Oberfläche des Stärkekorns von Debranching Enzymen zu Amylopektin „getrimmt“ wird. Die abgespaltenen Glucanketten werden möglicherweise von dem *D-Enzym*, für das bisher nur eine Beteiligung am Stärkeabbau vermutet wurde, der Amylopektinsynthese wieder zugeführt. Es ist noch nicht klar, ob dieses Enzym die Glucane direkt auf schon vorhandene Amylopektinmoleküle transferiert oder sie wie während des Stärkeabbaus der *Phosphorylase* zur Rückgewinnung der Glucosemoleküle zugänglich macht (COLLEONI et al. 1999). Das zweite Modell für die Beteiligung des Debranching Enzyms an der Stärkesynthese nimmt an, dass parallel zur Amylopektinsynthese am Stärkekorn die Synthese von Phytoglycogen aus Maltooligosacchariden im Stroma der Amyloplasten stattfindet. Die Glucan-abbauenden Enzyme im Stroma, zu denen auch die Phosphorylase gehört, könnten die Akkumulation des Phytoglycogens verhindern und somit die Synthese an der Stärkekornoberfläche fördern (ZEEMAN et al. 1998).

I.2 PFLANZLICHE α -1,4-GLUCAN-PHOSPHORYLASEN

In den meisten auf Phosphorylasen untersuchten Pflanzengeweben wurden mindestens zwei Aktivitäten beobachtet, von welchen eine in Plastiden und eine extraplastidär lokalisiert wurde (Spinatblätter: STEUP & LATZKO 1979, Kartoffelknollen: GERBRANDY 1974, Pappelholz: WITT & SAUTER 1995a). Erbsenblätter zeigten zwei auf Proteinebene unterscheidbare plastidische Phosphorylaseaktivitäten und in Kartoffelknollen konnte auf Genebene eine zweite plastidische Phosphorylase mit einer unterschiedlichen Primärstruktur identifiziert werden, die sich aufgrund ihrer Proteineigenschaften jedoch schwer von der ersten unterscheiden ließ (STEUP & LATZKO 1979 bzw. SONNEWALD et al. 1995). In Blättern der Fingerhirse (*Digitaria eriantha* Stent) wurden dagegen zwei cytosolische Phosphorylasen identifiziert (SHATTERS & WEST 1996). Auch in anderen Pflanzengeweben wurden multiple Phosphorylaseformen beobachtet, deren Lokalisierung bisher nicht überprüft wurde (Maiskörner: TSAI & NELSON 1968, Bananenfrüchte: SINGH & SANWAL 1975, Hirseblätter: VENKAIAH & KUMAR 1996). In nur wenigen untersuchten Geweben konnte nur eine Phosphorylaseform beobachtet werden (Bananenblätter: KUMAR & SANWAL 1982, Mungbohnen-samen: RICHARDSON & MATHESON 1977, Yamknollen: HAMDAN & DIOPOH 1991).

Nach Untersuchung der kinetischen Eigenschaften, Bestimmung des Molekulargewichts und der intrazellulären Lokalisation wurden die Phosphorylasen in zwei Gruppen eingeteilt: Typ I bzw. Typ H und Typ II bzw. Typ L (STEUP 1988 bzw. FUKUI et al. 1987). 1994 wurden die Phosphorylasetypen von der „Commission on plant gene nomenclature“ jedoch umbenannt, so dass Typ I bzw. Typ H nun als **Pho2**-Isoenzymtyp und Typ II bzw. Typ L als **Pho1**-Isoenzymtyp bezeichnet wird.

Das apparente Molekulargewicht eines Pho2-Enzyms liegt um 90 kD. Seine Affinität zu Maltooligosacchariden und nicht-verzweigten Polyglucanen ist niedrig. Zu verzweigten Polyglucanen wie löslicher Stärke, Amylopektin oder Glycogen zeigt die Pho2-Phosphorylase jedoch eine hohe Affinität, die sogar die Affinität der Kaninchenmuskelfosphorylase zu Glycogen übertreffen kann (FUKUI 1983). Sie kann darüber hinaus Stärkekörner direkt angreifen (STEUP et al. 1983). Lokalisiert ist Pho2 in Blättern im Cytosol der Mesophyll- und der Schließzellen (Erbse: CONRADS et al. 1986, Spinat: SCHÄCHTELE & STEUP 1986). In Keimlingen von Erbse und Saubohne wurde Pho2-Phosphorylase im Cytosol der Zellen des gesamten Embryos, einschließlich des Endosperms nachgewiesen (VAN BERKEL et al. 1991 bzw. BUCHNER et al. 1996).

Pho1-Enzyme haben mit mehr als 100 kD ein höheres Molekulargewicht als Pho2-Enzyme (STEUP 1988). Weiterhin zeichnen sich Pho1-Proteine durch eine hohe Affinität zu Maltooligosacchariden und unverzweigten Glucanen aus, während verzweigte Polyglucane und vor allem Glycogen schlechte Substrate sind. Im Gegen-

satz zu Pho2-Enzymen können Pho1-Phosphorylasen Stärkekörner nicht angreifen (STEUP et al. 1983). Pho1-Enzyme wurden im Stroma von Mesophyllzell-Chloroplasten (Erbse: CONRADS et al. 1986; Spinat: SCHÄCHTELE & STEUP 1986) und im Stroma von Amyloplasten lokalisiert (Erbse: VAN BERKEL et al. 1991, Saubohne: BUCHNER et al. 1996, Mais: MU et al. 2001). Pho1-Enzyme werden durch Maltotetraose und auch durch Cyclodextrine effektiv gehemmt, Pho2-Phosphorylasen kaum (STEUP & SCHÄCHTELE 1981 bzw. SHIMOMURA et al. 1982).

Die Phosphorylasetypen Pho1 und Pho2 haben unterschiedliche Primärstrukturen und stammen somit von verschiedenen Genen ab (MORI et al. 1991). Es handelt sich demnach um Isoenzyme, die anhand von immunologischen, chemischen und genetischen Merkmalen voneinander unterschieden werden können. Zum jetzigen Zeitpunkt sind neben den in dieser Arbeit präsentierten Weizen-Phosphorylasesequenzen die cDNA-Sequenzen von sieben plastidischen und vier cytosolischen Phosphorylasen bekannt: Pho1-Enzyme aus Kartoffel (NAKANO & FUKUI 1986 und SONNEWALD et al. 1995), aus Süßkartoffel (LIN et al. 1991), aus Saubohne (BUCHNER et al. 1996), aus Reis (HSU et al.¹) und aus Ackerschmalwand (SHINN et al.¹); außerdem Pho2-Enzyme aus Kartoffel (FUKUI et al. 1991), aus Saubohne (BUCHNER et al. 1996), aus Reis (HSU et al.¹) und aus Ackerschmalwand (CHENK et al.¹). Ein Vergleich der Sequenzen ergab, dass Pho1-Primärsequenzen in vier Bereiche eingeteilt werden können: das 45-70 Aminosäuren umfassende Transitpeptid, den N-terminalen Bereich, den 76-95 Aminosäuren umfassenden Insertbereich und den C-terminalen Bereich (SONNEWALD et al. 1995, ALBRECHT et al. 2001). Pho2-Primärsequenzen sind dagegen nur aus dem N-terminalen und dem C-terminalen Bereich zusammengesetzt. Innerhalb der pflanzlichen Phosphorylasen sind die Aminosäuresequenzen dieser zwei Bereiche mit ca. 80 % Identität hoch konserviert (LIN et al. 1995). Die für den Transport in Plastiden notwendigen Transitpeptide der plastidischen Phosphorylasen (BRISSON et al. 1989, VAN BERKEL et al. 1991) sind weniger als 30 % ähnlich zueinander, genauso wie die Insertregionen (ALBRECHT 1998).

Vergleiche zwischen den Sequenzen pflanzlicher Phosphorylasen am Beispiel der Kartoffel und von Phosphorylasen so unterschiedlicher Organismen wie Mensch, Wurm (*Dictyostelium*), Hefe, und Bakterium (*Escherichia coli*) zeigten eine Ähnlichkeit von 38 % (HUDSON et al. 1993). N- und C-Termini sind relativ variabel, aber der Proteinkern, beginnend mit dem ersten β -Faltblatt nach dem N-Terminus, welches Teil des katalytischen Zentrums ist, ist hoch konserviert (HUDSON et al. 1993 bzw. SCHILTZ et al. 1980, PALM et al. 1985). Die Bindungsstelle für den Cofaktor Pyridoxalphosphat ist so hoch konserviert, dass sie als Identifizierungssequenz für Phosphorylasen dienen kann (SCHÄCHTELE et al. 1978, CHOI et al. 1989). Weitere

¹ In der Datenbank GenBank (NCBI) publizierte Ergebnisse, die noch nicht gedruckt veröffentlicht wurden.

konservierte Bereiche liegen um die Mulde des reaktiven Zentrums und umfassen die Aminosäuren, die an der Bindung des Substrates beteiligt sind, sowie die Aminosäuren, die die Sekundärstrukturen für diese Bindungsstellen bilden (HUDSON et al. 1993). Nicht-konservierte Stellen befinden sich hauptsächlich auf der Oberfläche der Enzyme und betreffen somit nicht die interne Struktur (HUDSON et al. 1993).

Die Phosphorylaseproteine der verschiedenen Organismen unterscheiden sich stark in ihren Regulationsmechanismen. Das Hefeenzym benötigt die Phosphorylierung eines Threonins im N-terminalen Bereich des Proteins für die Ausbildung seiner maximalen Aktivität (BECKER et al. 1983). *Dictyostelium*-Phosphorylase 1 wird durch Phosphorylierung oder Bindung von AMP aktiviert (NARANAN et al. 1988). Die Phosphorylase der Vertebraten unterliegt einer wesentlich komplexeren Regulation. Einerseits wird sie durch allosterische Wechselwirkungen mit AMP und Glycogen aktiviert, mit ATP und Glucose-6-Phosphat (G6P) inhibiert. Für alle diese Effektoren wurden Bindungsstellen an der Röntgenkristallstruktur der Phosphorylase aus Kaninchenmuskel identifiziert (HUDSON et al. 1993). Andererseits wird ihre Aktivität durch kovalente Modifikation kontrolliert, nämlich durch die Phosphorylierung des Serin 14. Von allen diesen regulatorischen Sequenzbereichen des Vertebratenenzym konnte in den als „nicht-reguliert“ geltenden Phosphorylasen aus Bakterien und Pflanzen nur die G6P-Bindestelle gefunden werden: in der Glycogen-Phosphorylase von *E. coli* und in dem Pho1-Enzym aus Kartoffel (HUDSON et al. 1993). Alle anderen Bereiche sind nicht vorhanden oder verändert (LIN et al. 1991). Es wird daher angenommen, dass sich in der Evolution der allosterischen Kontrolle zunächst die Inhibition durch G6P entwickelt hat, gefolgt von der Kontrolle durch AMP und Phosphorylierung (HUDSON et al. 1993). Die Serin-Phosphorylierungsstelle der Vertebratenenzyme wurde höchstwahrscheinlich durch Fusion eines phosphorylierbaren Peptids an das Phosphorylaseprotein hinzugewonnen (PALM et al. 1985, HWANG & FLETTERICK 1986).

Der Insertbereich der plastidischen Phosphorylasen der Pflanzen ist einzigartig unter allen bekannten Phosphorylasen (HUDSON et al. 1993). Herkunft und Funktion dieses Bereichs ist noch nicht völlig geklärt. Einige Indizien sprechen dafür, dass es sich bei dem Insert um ein durch falsches Spleißen integriertes Intron handelt (NAKANO & FUKUI 1986). So befindet sich das 5'-Ende des Insertbereichs in der genomischen Sequenz der Kartoffel in unmittelbarer Nachbarschaft einer Intron/Exon-Spleißstelle. Darüber hinaus hat die Insertsequenz einen höheren AT-Gehalt als die Exonsequenzen, der aber dem AT-Gehalt der Intronsequenzen entspricht (CAMIRAND et al. 1990). Dies ist nicht der Fall im Gen der Saubohne und hier wurde auch kein Intron in der Nähe der Insertsequenz gefunden, so dass die Autoren zu dem Schluss kommen, dass es sich bei diesem Insert nicht um ein ehemaliges Intron handelt (BUCHNER et al. 1996). Die aus Vorhersagen resultierende räumliche Struktur des Inserts soll für die Diskriminierung von großen, verzweigten Polyglucanen durch

Pho1-Phosphorylasen verantwortlich sein, indem sie die Bindung z. B. der kurzen Seitenketten des Glycogens im aktiven Zentrum sterisch verhindert (MORI et al. 1993). LIN et al. (1991) vermuten in dem Insert ein vorrangiges Ziel von Proteasen. ALBRECHT et al. (2001) postulieren eine Beteiligung des Inserts bei der ohne Primer ablaufenden Synthesereaktion der Kartoffel-Phosphorylase.

Die Funktion der Phosphorylasen im Kohlenhydratmetabolismus der Pflanzen ist trotz intensiver Studien weiterhin ungeklärt. Die cytosolische Phosphorylase hat in den meisten Pflanzen aufgrund der intakten Plattenmembranen keinen Zugang zu Stärke. In manchen Pflanzengeweben, wie dem Keimblatt der Erbse und der Kartoffelknolle, kann sie aufgrund defekter Plattenmembranen direkt auf die Stärke einwirken. Möglicherweise trägt sie in anderen Geweben in Zeiten massiver Reservestärkemobilisierung oder bei Transportereignissen während des Reservestärkeaufbaus durch Synthese und Abbau eines löslichen Glucans zu der Aufrechterhaltung eines G1P-Gleichgewichts im Cytosol der Zellen bei, in die die Glucane transportiert werden (BUCHNER et al. 1996). Ausschalten des Gens in der Kartoffel durch Antisense-Inhibition hatte wenig Einfluss auf Stärke- und Saccharosegehalt der Pflanzen (DUWENIG et al. 1997a). Vielmehr wurde ein verändertes Wachstum beobachtet, das auf eine mögliche Rolle der cytosolischen Phosphorylase in der Entwicklung der Pflanze schließen ließ.

Von der plastidischen Phosphorylase wird generell vermutet, dass sie aufgrund des für eine Synthesereaktion ungünstigen Phosphat- zu G1P-Verhältnisses (s. I.1) am Abbau der Stärke im Plastiden beteiligt ist. Allerdings wurde erhöhte Aktivität und Expression von Transkript des plastidischen Enzyms in mehreren Pflanzen zu Zeitpunkten massiver Stärkesynthese gefunden (Mais: TSAI & NELSON 1968, Saubohne: BUCHNER et al. 1996, Kartoffel: ST-PIERRE & BRISSON 1995, Erbse: VAN BERKEL et al. 1991). Außerdem ist das Expressionsmuster des Phosphorylasetranskripts ähnlich dem Expressionsmuster von Stärke-synthetisierenden Enzymen und wird wie diese durch Saccharose induziert, unterliegt demnach möglicherweise derselben Kontrolle (ST-PIERRE & BRISSON 1995a bzw. DUWENIG et al. 1997b).

I.3 α -1,4-GLUCAN-PHOSPHORYLASEN AUS WEIZEN

Bisherige Untersuchungen von pflanzlichen Phosphorylasen konzentrierten sich auf die dikotylen Arten Kartoffel, Spinat und Erbse und das C₄-Gras Mais. Neben Kartoffel und Mais ist das C₃-Gras Weizen eine der Hauptanbaupflanzen zur Gewinnung von Stärke, was das Verständnis des Stärkemetabolismus dieser Pflanze erstrebenswert macht. Die Vorgänge bei der Mobilisierung der Reservestärke in Weizenkörnern und die Rolle der Amylasen in diesem Prozess wurden bereits eingehend untersucht (ZIEGLER 1995). Genauso wurden schon viele der an der Synthese der

Stärke im Endosperm beteiligten Enzyme auf die Expression ihrer Transkripte und Aktivität hin analysiert (AGPase: AINSWORTH et al. 1995, Stärkesynthasen: LI et al 1999 und 2000, Branching Enzym: NAIR et al. 1997). Über die Phosphorylasen aus Weizen liegen bisher nur wenige Erkenntnisse vor.

In Weizenblättern treten drei Formen von α -1,4-Glucan-Phosphorylaseaktivitäten auf (SCHUPP 1997, Diplomarbeit). Sie wurden aufgrund ihrer zunehmenden elektrophoretischen Mobilität im Glycogen-haltigen Polyacrylamidgel P1, P2 und P3 genannt. Kompartimentierungsanalysen zeigten, dass nur eine der drei Formen, P3, in den Chloroplasten vorkommt (s. Abbildung 1).

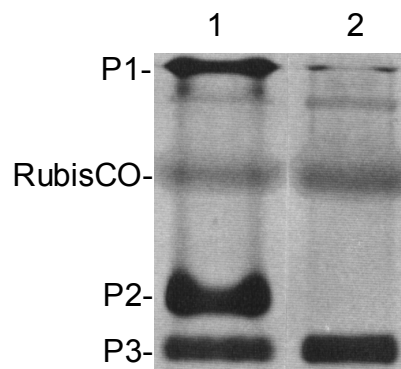


Abbildung 1: Zymogramm der stärkesynthetisierenden Phosphorylaseaktivität eines Protoplasten- (1) und eines Chloroplastenextrates (2) aus Mesophyllzellen junger Weizenblätter (SCHUPP 1997).

Die Auftrennung der Proben erfolgte durch PAGE in einem 7,5 %igen nicht-denaturierenden Gel mit 0,1 % einpolymerisiertem Glycogen. Durch Phosphorylaseaktivität während der Inkubation des Gels mit G1P gebildete Stärke wurde mit Jod blau angefärbt (II.2.4.4.1). Das Protein der RubisCO wird durch das Jod unspezifisch gelb angefärbt.

Bezeichnung der Phosphorylasen: **P1** = cytosolische Phosphorylase 1, **P2** = cytosolische Phosphorylase 2, **P3** = plastidische Phosphorylase, **RubisCO** = Ribulosebisphosphat-Carboxylase/Oxygenase.

Ohne einpolymerisiertes Substrat kann die Phosphorylaseaktivität nur als eine Bande nachgewiesen werden, wird jedoch Glycogen in das Gel einpolymerisiert, so trennen sich drei Formen auf. Eine cytosolische Form (P1) wandert kaum in das Gel ein, zeigt also eine hohe Bindungsaffinität zu Glycogen, während die zweite cytosolische Form (P2) weniger Affinität zu dem Glycogen hat und ähnlich läuft wie die plastidische Phosphorylase (P3). Diese geringe Affinität von P2 zu Glycogen ist sehr ungewöhnlich für eine cytosolische Phosphorylase (STEUP 1990), so dass eine gegenüber P1 abweichende Struktur vermutet wurde. Die cytosolischen P1- und P2-Aktivitäten konnten bis zum Beginn dieser Arbeit nicht vollständig voneinander getrennt werden. Eine Charakterisierung der Substratspezifität der durch Anionenaustauschchromatographie partiell gereinigten Enzyme ergab, dass die beiden cytosolischen Phosphorylaseaktivitäten eine hohe katalytische Affinität zu verzweigten Polyglucanen haben, während das plastidische Enzym lineare Oligosaccharide bevor-

zugt. Im Gegensatz zu publizierten Ergebnissen anderer pflanzlicher Phosphorylasen sind die cytosolischen Enzyme von Weizen durch Cycloheptaamylose hemmbar und nicht das plastidische Enzym (SHIMOMURA et al. 1982 bzw. SCHUPP 1997).

I.4 ZIELSETZUNG

Ziel dieser Arbeit war es, ein möglichst umfassendes Bild der in Weizen vorliegenden α -1,4-Glucan-Phosphorylasen zu erhalten. Dafür wurde eine Reinigung und Charakterisierung der cytosolischen und plastidischen Phosphorylaseformen aus Weizenblättern angestrebt. Mit Hilfe der gereinigten Enzyme sollten Antikörper zum Nachweis des Vorkommens von Phosphorylaseprotein in Weizenextrakten gewonnen werden. Eine Isolierung von cDNAs von Phosphorylasegenen aus einer cDNA-Bank junger Blätter sollte Aufschluss über die Primärstruktur der Weizenphosphorylasen gewähren und ermöglichen, ihre Ähnlichkeit zu bereits bekannten Phosphorylasesequenzen festzustellen. Die cDNAs sollten weiterhin für die Konstruktion spezifischer Sonden genutzt werden, mit denen Phosphorylasetranskript in RNA-Extrakten verschiedener Gewebe nachgewiesen werden konnte. Eine Studie der Expressionsmuster der verschiedenen Phosphorylasen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Blätter und Körner sollte Hinweise auf die Funktion der Weizenenzyme im Metabolismus der transitorischen Stärke und der Reservestärke der Weizenpflanze geben.

II MATERIAL UND METHODEN

II.1 MATERIAL

II.1.1 Pflanzenmaterial

Weizenpflanzen wurden aus Samen von *Triticum aestivum* L., var. Star gezogen. Die ungebeizten Samen stammten von der Firma F. v. Lochow-Petkus GmbH.

II.1.2 Bakterienstämme und Vektoren

Die folgende **Tabelle 1** zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und ihre wichtigsten genetischen Eigenschaften. *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21-CodonPlus™(DE3)-RIL und *E. coli* M15 [pREP4] dienten der Überexpression von cDNA. Durch PCR gewonnene Amplifikate wurden in *E. coli* DH5α [pREP4] oder *E. coli* TOP10F' transformiert. *E. coli* XL1-Blue MRF' war der Wirtsbakterienstamm für die λ-Phagen der cDNA-Bank. In *E. coli* SOLR wurde aus den λ-Phagen der cDNA-Bank das Phagemid pBluescript® gewonnen.

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz, Bezugsquelle
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus™(DE3)-RIL	<i>E. coli</i> B F ⁻ ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) dcm ⁺ Tet ^r gal λ(DE3) endA metA::Tn5(kan ^R) Hte [argU ileY leuW Cam ^r]	WEINER <i>et al.</i> (1994) Stratagene (Amsterdam, Niederlande)
<i>E. coli</i> DH5α	supE44 ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	HANAHAN <i>et al.</i> (1983) Stratagene
<i>E. coli</i> M15 [pREP4]	F ⁻ nal ^S str ^S rif ^S lac ⁻ ara ⁻ gal ⁻ mtl ⁻ recA ⁺ uvr ⁺ lon ⁺ pREP[kan ^R]	VILLAREJO <i>et al.</i> (1974) Qiagen (Hilden)
<i>E. coli</i> SOLR	e14 ⁻ (McrA ⁻) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 sbcC recB recJ uvrC umuC::Tn5 (Kan ^R) lac ⁻ gyrA96 relA1 thi-1 endA1 λ ^R [F'proAB lacI ^q ZΔM15] Su ⁻	HAY & SHORT (1992) Stratagene
<i>E. coli</i> TOP10F'	F'[lacI ^q Tn10(Tet ^R)] mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80 lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7679 galU galK rpsL(Str ^R) endA1 nupG	MEAD <i>et al.</i> (1991) Clontech (Heidelberg)
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'	Δ(mcr)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac ⁻ [F'pro AB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)]	BULLOCK <i>et al.</i> (1987) Stratagene

Tabelle 2 zeigt die verwendeten Vektoren. In pGEM[®]-TEasy wurden PCR-Amplifikate kloniert. pQE-30 enthält einen 6xHis-Tag und wurde für die heterologe Expression der cytosolischen Phosphorylase benutzt. Durch RACE gewonnene Amplifikate wurden in pT-Adv kloniert. λ-Uni-ZAP XR enthält eine cDNA-Bank 4 Tage alter Weizenblätter. Der Bakteriophage ExAssist wurde als Helferphage bei der in vivo-Excision des Phagemids pBluescript[®] II SK(+/-) aus λ-Uni-ZAP XR eingesetzt.

Tabelle 2: Verwendete Vektoren

Vektor	Resistenz	Selektion	Referenz, Bezugsquelle
pBluescript [®] II SK(+/-)	Amp ^r	lacZ'	SHORT <i>et al.</i> (1988) Stratagene
pGEM [®] -T Easy	Amp ^r	lacZ'	KNOCHE <i>et al.</i> (1999) Promega
pQE-30	Amp ^r		STÜBER <i>et al.</i> (1990) Qiagen
pT-Adv	Amp ^r , Kan ^r	lacZ'	MEAD <i>et al.</i> (1991) Clontech
λ-Uni-ZAP XR	Amp ^r	lacZ'	SHORT <i>et al.</i> (1988) Stratagene
ExAssist		lacZ'	SAMBROOK <i>et al.</i> (1989) Stratagene

II.1.3 Oligonukleotidprimer

In Tabelle 3 sind alle Oligonukleotidprimer aufgelistet, die für PCR oder RACE eingesetzt wurden. Bezogen wurden sie von der Firma MWG Biotech (Ebersberg). Sequenzierprimer wurden bei MWG Biotech entworfen und sind nicht aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotidprimer

Bezeichnung	Nukleotidsequenz
F1	5'-TACTACY ² TV ³ W ⁴ CH ⁵ ATGGAG-3'
R1	5'-ATR ⁶ ATY ² TGCT TR ⁶ AAB ⁷ ARB ⁷ CC-3'
F6	5'-AAGCAR ⁶ CAR ⁶ T ACACH ⁵ Y ² TV ³ TG C-3'
R3	5'-GGR ⁶ TTGTCAR ⁶ A AB ⁷ CY ² R ⁶ ATCC-3'
F13	5'-AAGM ⁸ GV ³ ATY ² C AY ² GAGTACAA G-3'
R9	5'-R ⁶ ATCTCV ³ ACR ⁶ TTB ⁷ GCB ⁷ CC-3'
K5F2	5'-CGGTTGCTTA CACCAATCAC-3'
S10F2	5'-AACCGTTGCA TACACTAACC-3'
K5R2	5'-ATCTGCGAAT TTCCGAAGCC-3'
S10R2	5'-CAGCAAACCTT CTTCAAGTCC-3'
SMART II⁹	5'-AAGCAGTGGT AACAAACGCAG AGTACGCGGG-3' ¹⁰

² Y=C oder T

³ V=G, A oder C

⁴ W=A oder T

⁵ H=A, C oder T

⁶ R=A oder G

⁷ B=G, T oder C

⁸ M=A oder C

3'-RACE cDNA Synthesepriemer⁹	5' -AAGCAGTGGT AACAAACGCAG AGTAC (T) ₃₀ V ³ N ¹¹ -3' ¹⁰
5'-RACE cDNA Synthesepriemer⁹	5' - (T) ₂₅ V ³ N ¹¹ -3' ¹⁰
Universal Primer lang⁹	5' -CTAATACGAC TCACTATAGG GCAAGCAGTG GTAACAACGC AGAGT-3' ¹⁰
Universal Primer kurz⁹	5' -CTAATACGAC TCACTATAGG GC-3' ¹⁰
cbrev	5' -AGCCTGCCCCA AGCCACCATT TCCCAGAGCC GC-3' ¹⁰
pbrev	5' -CAGAGTCAGA CTGCGCCTTC TTCTCTGTTG TCTCGG-3' ¹⁰
pbfor	5' -TACTTCCTGA AGCCCTGGAG AAGTGGAGCT TGGAC-3' ¹⁰
ckfor	5' -TGGTAATCCC CACCCGGAAG GATATGGAGG GAAAG-3' ¹⁰
ckrev	5' -TCTGCGAATT TCCGAAGCCC GGTGAGAAGA TCAAG-3' ¹⁰
pkfor1	5' -CCGTTGCATA CACTAACCAC ACAGTACTTC CTGAAGCTCT GG-3' ¹⁰
pkrev	5' -CCAACGCCTG GGGGTCACCTC CATTTGTTTT GTTTTG-3' ¹⁰
18SF1¹²	5' -CGTCCTTTCT CTCTTTCC-3' ¹⁰
18SR1¹²	5' -TGTTACGACC TTCTCCTTCC-3' ¹⁰
InsertUni	5' -GGATCTAACT CATAACAGG-3' ¹⁰
InsertRev	5' -TGGAACGGCA GATATTTTAC-3' ¹⁰
STS2uni¹³	5' -AGTCGTTCTG CCGTATGATG TCG-3' ¹⁰
STS2rev¹³	5' -TGTTGAGGTT CCATGGCACG TTG-3' ¹⁰
Pcyt_start_Sph1	5' -CTGCATGCAT CGAGGGTAGA ATGAGTGCGG CGGACAAGG-3' ¹⁰
Pcyt_stop_Sal1	5' -CTGTCGACGT CTCCTCTTCA TGGAACAGGG CAAGC-3' ¹⁰

II.1.4 Chemikalien und Verbrauchsmittel

Puffersubstanzen, Salze und Lösungsmittel

Die in dieser Arbeit benutzten Puffersubstanzen, Salze und Lösungsmittel wurden von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Merck (Darmstadt), ICN (Eschwege), Biomol (Hamburg), Serva (Heidelberg) oder Fluka (Neu-Ulm) bezogen und hatten p.a.-Qualität.

Medien

Hefeextrakt, Bacto-Trypton (Pepton No. 140) und Bacto-Agar, sowie das Fertigmedium NZY Broth wurden von der Firma GibcoBRL (Eggenstein) bezogen.

Radiochemikalien, Röntgenfilme und Entwickler

[α -³²P]-dATP und [α -³²P]-dCTP stammten von der Firma NEN-DuPont (Bad Homburg), Röntgenfilme (Hyperfilm: RPN7H) von der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) und Kodak GBX Entwickler und Fixierer von der Firma Sigma.

Die Bezugsquellen der weiteren Materialien sind an der entsprechenden Stelle aufgeführt.

⁹ Bestandteil des SMART™ RACE cDNA Amplification Kits (Clontech)

¹⁰ Stratagene

¹¹ N=A, C, G oder T

¹² erhalten von Dr. Alfons Weig, Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, Universität Bayreuth

¹³ Primersequenzen aus Li et al 1999

II.1.5 Computerprogramme

DNA-Sequenzen wurden mit dem Software-Paket der "University of Wisconsin Genetics Computer Group" (GCG) in der Windows-Version W²H 4.0 (DEVEREUX et. al. 1983) erstellt und ausgewertet. Diese an der Universität Bayreuth installierte Software ermöglicht den Zugriff auf aktuelle Datenbanken. Zur weiteren Datenbankrecherche wurde auf folgende im Internet zur Verfügung stehende Server zurückgegriffen:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://www.ebi.ac.uk>

<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetStart/>

II.2 METHODEN

II.2.1 Anzucht und Ernte des Pflanzenmaterials

Für die Versuche wurde Sommerweizen der Sorte Star (*Triticum aestivum* L., var. Star) verwendet. Vor der Aussaat wurden die Körner zur Oberflächensterilisation ca. 30 min lang in 0,3 % 8-Hydroxychinolinsulfat inkubiert, anschließend gewaschen und über Nacht (üN) in Leitungswasser bei 4 °C gequollen. Die Anzucht der Weizenpflanzen erfolgte in einem Klimaraum (BBC York) bei einer konstanten Temperatur von 20 °C, einer relativen Luftfeuchte von 60-70 % und einer 16-stündigen Lichtphase bei einer Lichtintensität von 360 µE. Die Anzuchtbedingungen variierten je nach Verwendungszweck, wie im folgenden beschrieben:

Reinigung von Phosphorylaseprotein

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte 7-8 Tage lang auf Vermiculit. Aufgrund der schwindenden Keimungsfähigkeit wurde die Luftfeuchte in der Anzuchtsbox (32 l Plastikbox) durch Abdecken mit Frischhaltefolie erhöht. Die geernteten Pflanzen wurden entweder sofort weiterverarbeitet oder bei –80 °C gelagert.

Isolierung von RNA zur cDNA-Herstellung

Die Aussaat erfolgte auf Erde. Die 4 Tage alten Weizenblätter wurden nach der Ernte in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur Verwendung bei –80 °C gelagert.

Isolierung von RNA zur Northernblot-Analyse

Keimende Körner: Oberflächensterilisierte, gequollene Körner wurde 6 Tage lang auf feuchtem Zellstoff bei Raumtemperatur inkubiert. Jeden Tag wurde eine Probe entnommen.

Blüten und sich entwickelnde Körner: Keimlinge wurden 3-4 Tage auf Vermiculit bei Raumtemperatur vorgezogen. Je ca. 30 Pflanzen wurden anschließend in 1 m lange Balkonkästen in mit Depotdünger versetzter Erde der Universitätsgärtnerei umgesetzt. Gegossen wurde mit Leitungswasser. Nach 52 bis 54 Tagen öffneten sich die Blüten. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle 2 Tage Kornproben entnommen, bis die Körner nach ca. 50 Tagen reif waren. Das geerntete Material wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend bei –80 °C gelagert.

II.2.2 Bakterienanzucht

II.2.2.1 Nährmedien

Die Nährmedien wurden bei 121 °C und 1 bar 20 min lang autoklaviert. Feste Medien enthielten 1,5 % (w/v) Agar. Antibiotika und andere Zusätze wurden sterilfiltriert (Filtropur S 0,2 µm, Sarstedt) nach dem Autoklavieren und der Abkühlung des Mediums auf ca. 55 °C zugegeben.

LB-Medium:	Bacto-Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
X-Gal-Platten:	LB-Platten mit	0,004 % (w/v) X-Gal 40 µM IPTG
SOC-Medium	Bacto-Trypton	20 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	0,6 g/l
	KCl	0,2 g/l
	MgCl ₂	2,0 g/l
	MgSO ₄	2,5 g/l
	Glucose ¹⁴	4,0 g/l
NZY-Medium	NZY-Fertigmedium	21 g/l
	(Gibco-BRL)	
NZY-Topagar	NZY-Medium mit	0,8 % (w/v) Agarose (Roth, Karlsruhe)

Antibiotika, X-Gal (5-Brom-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid) und IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid) wurden als folgende Stammlösungen zugegeben:

Ampicillin	100 mg/ml in A. bidest/NaOH, sterilfiltriert
Kanamycin	50 mg/ml in A. bidest, sterilfiltriert
Tetracyclin	50 mg/ml Ethanol
Chloramphenicol	34 mg/ml Ethanol
IPTG	1 M in A. bidest, sterilfiltriert
X-Gal	2 % in N,N'-Dimethylformamid

II.2.2.2 Über-Nacht-Kultur

Zur Plasmidpräparation in kleinem Maßstab, als Vorkultur oder zur Herstellung einer Dauerkultur wurden 2 bis 4 ml LB-Medium (gegebenenfalls mit Antibiotikumsatz) in einem sterilen 13 ml-Plastikröhrchen mit einer *E. coli*-Einzelkolonie beimpft und üN bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt. Größere Bakterienmengen wurden in Erlenmeyerkolben mit LB-Medium angezogen, die mit 1/100 Volumen Vorkultur angeimpft wurden.

II.2.2.3 Dauerkulturen

Für eine Lagerung von Bakterienstämmen über mehr zwei Wochen hinweg wurden Glycerinstammkulturen angelegt. Hierfür wurden 800 µl einer Über-Nacht-Kultur mit 200 µl sterilem Glycerin versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei –80 °C. Zur Wiederanzucht wurden geringe Mengen der gefro-

¹⁴ Die sterilfiltrierte Glucoselösung wurde nach dem Autoklavieren des Mediums zugesetzt.

renen Suspension entnommen und auf eine LB-Platte ausgestrichen. Letztere dienten auch der kurzzeitigen Lagerung der Bakterien bis zu vier Wochen.

II.2.2.4 Kulturen zur heterologen Expression von Phosphorylase-cDNA

LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und entweder 25 µg/ml Kanamycin oder 34 µg/ml Chloramphenicol wurde mit 1/20 Volumen einer Vorkultur von *E. coli* M15/pQE-30 oder von *E. coli* BL21-CodonPlus™(DE3)-RIL/pQE-30 angeimpft und bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 angezogen. Nach Abnahme einer Probe wurde die Proteinexpression mit IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert und die Zellen nach 4-6 h geerntet.

II.2.2.5 Bestimmung der optischen Dichte von Bakterienkulturen

Die optische Dichte (OD₆₀₀) von Flüssigkulturen wurde in Plastikkuvetten mit 1 cm Schichtdicke bei einer Wellenlänge von 600 nm im Photometer (DU-50 Spektrophotometer, Beckman) bestimmt.

II.2.3 Molekularbiologische Methoden

II.2.3.1 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen wurden autoklaviert (20 bis 30 min bei 121 °C und 1 bar) oder sterilfiltriert (Filtropur S 0,2 µm, Sarstedt). Lösungen für die Isolierung von RNA (mit Ausnahme der Tris-haltigen Lösungen) wurden mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) (v/v) versetzt, üN bei Raumtemperatur (RT) gerührt und anschließend autoklaviert.

Allgemein verwendete Puffer und Lösungen sind im folgenden aufgelistet. Bestimmte, für eine Methode benötigte Puffer oder Lösungen sind im jeweiligen Abschnitt angegeben.

Blockier-DNA:	50 mg/ml Heringssperma-DNA (Roth) in A. bidest, pH 7,0-8,0 mit NaOH, 5 min Ultraschallbad, vor Verwendung 10 min 95 °C
Cl:	Chloroform/Isoamylalkohol 50/1 (v/v), überschichtet mit DEPC-H ₂ O
DEPC-H ₂ O:	0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat in A. bidest, üN bei RT gerührt, dann autoklaviert
EtBr-Stammlösung:	10 mg/ml Ethidiumbromid in A. bidest
Lysozym-Stammlösung:	10 mg Lysozym aus Hühnereiweiß (Roth)/ml 10 mM Tris/HCl pH 8,0
10xMOPS:	200 mM MOPS/NaOH pH 7,0, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA
PCI:	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25/24/1 (v/v/v) äquilibriert in TE-Puffer (Roth)
RNaseA-Lösung:	10 mg RNaseA (Boehringer)/ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 15 mM NaCl
SM-Puffer:	100 mM NaCl, 8 mM MgSO ₄ x 7 H ₂ O, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,001 % Gelatine

20xSSC:	3 M NaCl, 0,3 M Tri-Natriumcitrat/HCl pH 7,0
STET:	100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 5 % Triton X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol, Sigma)
50xTAE-Puffer:	2 M Tris/Acetat, 0,5 M EDTA
TBS:	20 mM Tris/HCl pH 7,5, 500 mM NaCl
TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl pH 7,5 oder 8,0, 1 mM EDTA

II.2.3.2 Transformation von *E. coli*

II.2.3.2.1 Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli* erfolgte nach der Mehr-Ionentechnik (verändert nach HANAHAN et al., 1983). 250 ml LB-Medium, das 20 mM MgSO₄ enthielt, wurde mit 2,5 ml einer Über-Nacht-Kultur beimpft und bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 erreicht war. Die Zellen wurden dann bei 2.000 g (Centricon T-124, Kontron Instruments AG) und 4 °C 5 min lang sedimentiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 100 ml eiskaltem TFB1 resuspendiert und 5 min lang auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen erneut wie oben beschrieben zentrifugiert und anschließend in 10 ml eiskaltem TFB2 aufgenommen. Nach einer Inkubation von mindestens 15 min auf Eis wurden 200 µl-Aliquote der Suspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C aufbewahrt.

TFB1-Puffer:	Kaliumacetat/Essigsäure pH 5,8	30 mM
	CaCl ₂	10 mM
	MnCl ₂	50 mM
	RbCl	100 mM
	Glycerin	15 % (v/v)
TFB2-Puffer	MOPS/NaOH pH 6,5	10 mM
	CaCl ₂	75 mM
	RbCl	10 mM
	Glycerin	15 % (v/v)

Beide Puffer wurden sterilfiltriert und bei RT aufbewahrt.

II.2.3.2.2 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 1-10 ng der zu transformierenden Plasmid-DNA vermischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen einer Hitzeschockbehandlung (45 s bei 42 °C im Wasserbad) unterzogen. Nach weiteren 2 min auf Eis wurde 1 ml LB- oder SOC-Medium zugegeben und die Zellen zur Expression der Plasmid-kodierten Antibiotika-Resistenz für 1 h bei 37 °C inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen auf Antibiotika-haltige Platten ausplattiert und diese üN bei 37 °C inkubiert.

II.2.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab („Boiling-prep“, verändert nach HOLMES & QUIGLEY, 1981)

Nur kleine Mengen an Plasmid-DNA benötigt man zur Überprüfung des Restriktionsendonuklease-Schnittmusters. Zur Gewinnung geringer Mengen wurde die „Boiling-prep-Methode“ angewendet.

1,5 ml einer Über-Nacht-Kultur wurden 30 s bei 13.000 g (Centrifuge 5415 C, Eppendorf) und RT zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 350 µl STET (s. II.2.3.1) resuspendiert, 25 µl Lysozym-Stammlösung zugegeben und 3 s lang gemischt. Anschließend wurde die Suspension 40 s lang gekocht und dann sofort 10 min bei 13.000 g und RT zentrifugiert. Der Niederschlag ließ sich mit einem sterilen Zahnstocher entfernen. Die im Überstand enthaltenen Nukleinsäuren wurden mit 33 µl 3 M Natriumacetat/Essigsäure pH 5,2 und 420 µl Isopropanol 5 min bei RT gefällt. Das durch 5-minütige Zentrifugation bei 13.000 g und RT sedimentierte Pellet wurde mit 1 ml eiskaltem 70 %-igen Ethanol gewaschen, wiederum 1 min zentrifugiert und getrocknet. Letztlich wurde die DNA in 40 µl TE pH 7,5 oder 8,0 aufgenommen, je nach pH-Optimum des verwendeten Restriktionsenzym.

Präparative Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Sequenzierung von DNA, zur Klonierung und zur Herstellung von DNA-Sonden werden größere Mengen möglichst reiner DNA benötigt. Hierfür wurde zunächst der QIAfilter Plasmid Midi Kit und später der HiSpeed Plasmid Midi Kit verwendet, beide von Qiagen. 50 oder 100 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum wurden mit 1/500 Volumen einer Über-Nacht-Kultur angeimpft und dann 12-16 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Für die weitere Plasmidisolation wurden die Angaben des Herstellers befolgt.

II.2.3.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit von DNA und RNA in wässriger Lösung wurde photometrisch (Spectrophotometer DU 650, Beckman) in einer 10 µl-Quarzküvette bestimmt. Eine Absorptionseinheit bei 260 nm (A_{260}) entspricht bei einer Schichtdicke von 1 cm 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 40 µg/ml RNA oder einzelsträngiger DNA (IBELGAUFTS 1990). Die Reinheit der DNA kann durch das Verhältnis der Absorption A_{260} zu A_{280} bestimmt werden (WARBURG & CHRISTIAN 1942). Der Quotient A_{260}/A_{280} sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

II.2.3.5 Ethanolpräzipitation von DNA

Die Ethanolpräzipitation dient der Reinigung und Konzentrierung von DNA. Der Nukleinsäurelösung wird 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat/Essigsäure pH 5,2 und 2,5 Volumen Ethanol zugesetzt. Je nach weiterem Verwendungszweck wird entwe-

der bei RT üN oder bei -20°C mindestens 1 h gefällt. Durch Zentrifugation (13.000 g, 30 min und RT oder 4°C) wird die DNA sedimentiert. Nach Trocknung des Präzipitats in einem Vakuum-Exsikkator wurde es je nach Verwendungszweck in A. bidest oder TE-Puffer gelöst oder zur Sequenzierung trocken verschickt.

II.2.3.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsanalysen wurden mit Restriktionsendonukleasen der Firma MBI Fermentas (Vilnius, Litauen) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Das Enzym wurde im Überschuss eingesetzt, um eine möglichst vollständige Spaltung zu gewährleisten. Die Inkubationszeit bei der jeweils optimalen Temperatur betrug immer mindestens 1 h. Wurde eine DNA mit zwei Enzymen geschnitten, deren Anforderungen an das Puffersystem verschieden war, so wurden die Spaltungen hintereinander durchgeführt und die DNA zwischendurch mittels Agarosegelelektrophorese und anschließender Elution aus dem Gel umgepuffert. Ein Reaktionsansatz mit einem Volumen von 20 μl setzte sich wie folgt zusammen:

DNA (in A. bidest oder TE-Puffer)	$\leq 1 \mu\text{g}$
Reaktionspuffer (10-fach konzentriert)	2,0 μl
Restriktionsendonuklease	2-10 Units
A. bidest	ad 20 μl

Wurden größere DNA-Mengen gespalten, so wurde das Volumen des Reaktionsansatzes dementsprechend erhöht. Nach der Inkubation wurde dem Ansatz 1/6 Volumen Auftragspuffer (Loading Dye, MBI Fermentas) zugesetzt, wenn eine Elektrophorese durchgeführt werden sollte. Handelte es sich um Plasmid-DNA aus einer Boiling-prep, so enthielt der Auftragspuffer 1 μl RNaseA-Stammlösung. Der Reaktionsansatz wurde nach der Spaltung noch 15 min bei RT inkubiert um die enthaltene RNA abzubauen.

II.2.3.7 Agarosegelelektrophorese von DNA und Elution von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge erfolgte in horizontalen Agarosegelen. Es standen 2 Flachbettgelkammern unterschiedlicher Größe zur Verfügung: EasyCast™ B1A mit einer Gelgröße von 7 x 8 cm und B2 mit 12 x 14 cm, beide von OWL Separation Systems, USA. Die Agarose (NEEO, Roth) wurde in einer Konzentration von 0,8 bis 2 % (w/v) in 1-fach konzentriertem TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst, nach dem Abkühlen auf ca. 50°C mit 0,2 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid versetzt und in die mit einem Gelkamm versehene Gelkammer gegossen. Die mit Auftragspuffer (s. o.) versetzten DNA-Proben wurden in die Geltaschen pipettiert und bei 50 bis 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Der Laufpuffer war ebenfalls 1 x TAE. Als Größenstandard wurden, je nach Größe der aufgetragenen DNA, entweder 0,6 μg der 100 bp DNA Ladder Plus oder 0,6 μg der 1 kb DNA Ladder (beide MBI Fermentas) benutzt. Zur Dokumentation wurde eine

Image-Master[®] VDS Kamera (Thermal imaging system FTI-500, Pharmacia Biotech) verwendet.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die zu eluierenden DNA-Fragmente auf der UV-Durchlichtbank (Reprostar II, Camag) mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Elution der DNA wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die DNA wurde in 30 µl Elutionspuffer aufgenommen.

II.2.3.8 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Eine intramolekulare Ligation der Plasmid-DNA bei Ligationsreaktionen wurde durch den Einsatz dephosphorylierter Vektoren verhindert. Hierzu wurde zu dem Reaktionsansatz, der die Restriktionsendonuklease enthielt mit der der Vektor geöffnet werden sollte, 0,2 Units alkalische Phosphatase (Shrimp alkaline phosphatase, Amersham, Cleveland, USA) hinzugefügt, die die Phosphatgruppen am 5'-Ende entfernt. Die Inkubation mit Restriktionsenzym und alkalischer Phosphatase wurde über Nacht bei 37 °C durchgeführt, die Reaktion dann durch 15-minütiges Erhitzen auf 65 °C gestoppt.

II.2.3.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten und linearisiertem, dephosphoryliertem Vektor wurde mit T4-DNA Ligase (Amersham) durchgeführt. Zur Erhöhung der Ausbeute an rekombinanter DNA wurden je nach Bedarf zwei verschiedene DNA-Massenverhältnisse getestet: entweder ein Insert-DNA zu Plasmid-DNA Verhältnis von 3 zu 1 oder von 1 zu 1. Berechnet wurde das Massenverhältnis nach folgender Formel:

$$ng\ Insert = \frac{ng\ Plasmid \times Kb\ Insertgröße}{Kb\ Plasmidgröße} \times \frac{Mol\ Insert}{Mol\ Plasmid}$$

Der Reaktionsansatz für eine Ligation setzte sich wie folgt zusammen:

Ligationspuffer (10x)	1 µl
T4-DNA Ligase	0,5 U
zu ligierende DNA und Vektor	<8 µl
A. bidest	ad 10 µl

Die Reaktion erfolgte üN bei 12 °C. 1 bis 5 µl des Ansatzes wurden in *E. coli* transformiert und der Rest bei –20 °C gelagert.

Zur Klonierung von PCR-Fragmenten wurde der pGEM[®]-T Easy-Klonierungskit von Promega verwendet. Die Klonierung von RACE-Fragmenten wurde mit dem AdvanTAge[™] PCR Cloning Kit (Clontech) durchgeführt.

II.2.3.10 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte anfangs am Lehrstuhl für Pflanzensystematik der Universität Bayreuth mit dem Automated Laser Fluorescent DNA Sequen-

cer (ALF) der Firma Pharmacia. Später wurden die Sequenzierungen bei der Firma MWG Biotech (Ebersberg) in Auftrag gegeben.

II.2.3.11 PCR-Amplifikationen

II.2.3.11.1 PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten

Die Amplifikation von Sonden oder die Identifikation von Phosphorylaseklonen wurde mittels PCR erreicht. Die PCR-Ansätze hatten Endvolumina von 25 bis 50 µl und wurden auf Eis in 500 µl PCR-Reaktionsgefäßen (Multiply-Pro, Sarstedt, Nümbrecht), 200 µl PCR-5er-Streifen (PCR 5-Strip Tubes, Eppendorf, Hamburg) oder in 200 µl PCR-25er-Platten (Thermo-Fast® 25, Abgene, Hamburg) zusammenpipettiert. Die 200 µl PCR-25er-Platten wurden mit klebender Aluminiumfolie (Adhesive Sealing Foil, ABgene) verschlossen.

PCR-Ansatz:

PCR-Puffer (10x mit 15 mM MgSO ₄)	2,5 µl
Sense-Primer (10 pmol/µl)	1,0 µl
Antisense-Primer (10 pmol/µl)	1,0 µl
dNTP-Mischung (jedes 10 mM)	0,5 µl
Taq-DNA-Polymerase (2,5 U/µl, Qiagen)	0,25 µl
Template-DNA	0,25 µg
A. bidest	ad 25 µl

Bei einer Heizblocktemperatur von 95 °C wurden die PCR-Ansätze in den Thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf) gestellt und nach einem initialen Denaturierungsschritt von 1 min 95 °C, 30 bis 35 Zyklen nach folgendem Schema durchgeführt:

1 min 95 °C	Denaturierung
1 min 45 °C, 50 °C, oder 55 °C	Primerbindung
1,5 min 72 °C	Primerextension

Nach einer auf 10 min verlängerten Primerextension am Ende des Programms kühlte der Thermocycler auf 4 °C ab. Die Reaktionsansätze wurden zur Reinigung oder zur Überprüfung im Agarosegel aufgetrennt und gewünschte Banden eluiert. Bei jeder Reaktion war eine Kontrolle ohne Template-DNA enthalten, die die Reinheit der eingesetzten Lösungen gewährleistete.

II.2.3.11.2 PCR zur Einführung von Schnittstellen

Die Klonierung der Phosphorylase-cDNA in den Expressionsvektor pQE-30 erforderte die Einführung geeigneter Schnittstellen in die cDNA. Dies wurde durch PCR mit der in dem Vektor pBluescript vorliegenden cDNA als Template und Primern erreicht, die die Erkennungssequenz der gewünschten Restriktionsendonuklease trugen. Um eine möglichst fehlerfreie Amplifikation der cDNA zu erreichen, wurde die akkuratere Pfu-Polymerase anstelle der Taq-Polymerase eingesetzt.

PCR-Ansatz:

PCR-Puffer (10x mit 20 mM MgSO ₄)	5,0 µl
Primer Pcyt_start_Sph1 (10 pmol/µl)	2,0 µl
Primer Pcyt_stop_Sal1 (10 pmol/µl)	2,0 µl
dNTP-Mischung (jedes 10 mM)	1,0 µl
PfuTurbo [®] -DNA-Polymerase (2,5 U/µl, Stratagene)	0,5 µl
Template-DNA	2,0 ng
A. bidest	ad 50 µl

Die Pfu-Polymerase benötigte nach einem initialen Denaturierungsschritt von 1 min bei 95 °C nur 22 Zyklen nach folgendem Schema:

1 min 95 °C	Denaturierung
1 min 69 °C	Primerbindung
2 min 72 °C	Primerextension

Nach weiteren 10 min bei 72 °C wurden die Reaktionen auf 4 °C heruntergekühlt, in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt und die gewünschten Banden eluiert.

II.2.3.11.3 PCR zur Amplifizierung von cDNA-Enden ("RACE, rapid amplification of cDNA-ends")

cDNA-Fragmenten, die aus einer cDNA-Bank isoliert werden, fehlen häufig Sequenzabschnitte am 5'- oder 3'-Ende. Es ist möglich, die Endsequenzen solcher cDNAs durch eine spezifische PCR, RACE genannt, zu erhalten. Dafür wurde zunächst die RNA mit speziellen Primern nach Anleitung des Herstellers (SMART[™] RACE cDNA Amplification Kit, Clontech, Heidelberg) revers transkribiert, einmal für die 5'-Reaktion und einmal für die 3'-Reaktion. Die so erhaltenen cDNAs wurden dann in folgender PCR-Reaktion eingesetzt:

PCR-Ansatz (Komponenten mit Ausnahme des spezifischen Primers von Clontech):

Advantage2 [®] -Puffer (10x mit 25 mM MgSO ₄)	2,5 µl
Spezifischer Primer 5' oder 3' (10 pmol/µl)	1,25 µl
Universal-Primer-Mix (10 pmol/µl)	1,0 µl
dNTP-Mischung (jedes 10 mM)	0,5 µl
50x Advantage2 [®] Polymerase Mix	0,5 µl
Template-cDNA, 5' oder 3'	0,25 µl
A. bidest	ad 25 µl

Das Programm, das für eine RACE-Reaktion benötigt wird, ist im folgenden dargestellt:

30 s 94 °C	initiale Denaturierung
5 Zyklen:	
30 s 94 °C	
3 min 71 °C	
5 Zyklen	
30 s 94 °C	
10 s 70 °C	
3 min 71 °C	

27 bis 30 Zyklen	
30 s 94 °C	Denaturierung
10 s 66 °C, 68 °C oder 70 °C	Primerbindung
3 min 72 °C	Primerextension
Abkühlung auf 10 °C	

Die erhaltenen Amplifikate wurden nach einer Analyse auf dem Agarosegel in den Vektor pT-Adv ligiert.

II.2.3.12 Isolierung von PolyA⁺-RNA aus Weizenblättern

Arbeiten mit RNA wurden nur mit neuen, sterilen Plastikwaren, Filterspitzen (Peglab, Erlangen) und üN (mindestens 4 h) bei 180 °C geglühten Glaswaren durchgeführt.

mRNA wurde aus 4 Tage alten Weizen-Primärblättern mit Hilfe des MPG™ Direct mRNA Purification Kit (Genaxis, Spechbach) isoliert. Die Blätter wurden unter flüssigem Stickstoff gemörser und je g Blattmaterial 5 ml Extraktionspuffer zugegeben. Die Suspension wurde dann 4 min lang bei mittlerer Geschwindigkeit mit einem Ultraturrax (TP 18/10, Janke und Kunkel KG) im Eisbad homogenisiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 17.000 g wurde der RNA-haltige Überstand abgenommen und auf Eis gelagert. Jeweils 1,5 ml des Überstandes wurde zu 1 mg MPG-Streptavidin-Partikeln gegeben, die zuvor mit 10 µl biotinyliertem Oligo-dT₂₅ nach Angaben des Herstellers gekoppelt wurden. Nach 3-minütigem Schütteln bei RT wurden die Partikel mit Hilfe eines Magneten fixiert, der Überstand verworfen und die Partikel mit 1 ml Waschpuffer 1 gewaschen. Nach einem weiteren Waschschrift mit Waschpuffer 2 wurde die RNA mit 20 µl Release Solution durch 2-minütiges Erwärmen auf 65 °C von den Partikeln eluiert. Die RNA-haltige Lösung wurde in einem RNase freien Reaktionsgefäß gesammelt. Diese Prozedur wurde mit denselben MPG-Streptavidin-Partikeln so lange wiederholt, bis der gesamte Rohextrakt verarbeitet war. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt und die RNA bei -80 °C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

Extraktionspuffer:	Tris/HCl pH 8,0	100 mM
	LiCl	500 mM
	EDTA	10 mM
	LiDS	1 %
	DTT	5 mM
Waschpuffer 1:	Tris/HCl pH 8,0	10 mM
	LiCl	150 mM
	EDTA	1 mM
	LiDS	0,1 % (v/v)
Waschpuffer 2:	Tris/HCl pH 8,0	10 mM
	LiCl	150 mM
	EDTA	1 mM
Release Solution:	EDTA pH 8,0	2 mM

II.2.3.13 Reverse Transkription von RNA

PolyA⁺-RNA oder Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des „First Strand cDNA Synthesis Kit“ von MBI Fermentas nach Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Das cDNA-RNA-Hybrid wurde bis zu seiner Verwendung bei –20 °C gelagert.

II.2.3.14 cDNA-Bank-Herstellung und Screening

II.2.3.14.1 cDNA-Synthese

Zur Herstellung der cDNA-Bank wurde der ZAP-cDNA[®] Synthesis Kit (Stratagene) verwendet. Es wurden 5,8 µg PolyA⁺-RNA nach den Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Der Synthesereaktion für den zweiten Strang wurden 20 µCi [α -³²P]dATP hinzugefügt. So war es möglich, die Aufreinigung mit dem Geigerzähler zu verfolgen. Darüber hinaus konnte nach Elektrophorese mit einem 5 %igen Polyacrylamidgel (s. II.2.3.14.2) die Verteilung der radioaktiven Banden nach der Größenfraktionierung überprüft und so die Fraktionen ausgesucht werden, die weiterverwendet wurden.

II.2.3.14.2 Nicht-denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese für DNA

Die Größenfraktionierung der cDNA-Synthese wurde auf einem 5 %igen Polyacrylamidgel (Multigel Long-System 11,0 cm x 11,5 cm x 0,1 cm, Biometra, Berlin) überprüft. Jeweils 8 µl der 6 erhaltenen Fraktionen (Fraktion 5 bis 10) wurden mit 2 µl Auftragspuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Nach der 3-stündigen Elektrophorese bei 100 V in dem Laufpuffer 1xTBE wurde das Gel zunächst 5 min in 7 %iger Essigsäure, dann kurz in A. bidest gewaschen und anschließend 30 min bei 60 °C getrocknet. Die Exposition fand 17 h lang bei RT statt. Nach der Entwicklung (s. II.2.3.14.5) wurde die Fraktion mit den offensichtlich längsten cDNA-Fragmenten und dem höchsten Gehalt an DNA ausgesucht: Fraktion 6.

Gelzusammensetzung:	Acrylamid ¹⁵	5 %
	5xTBE	4 ml
	APS	140 µl
	TEMED	7 µl
	A. bidest	ad 20 ml
5xTBE:	Tris/Borat	450 mM
	EDTA	10 mM

II.2.3.14.3 Ligation der cDNA in den Uni-ZAP XR-Vektor und Verpackung in die λ -Phagen

3 µl der cDNA der Fraktion 6 wurden in den Uni-ZAP XR-Vektor auf folgende Weise ligiert:

¹⁵ 30 %ige (w/v) Stammlösung mit einem Verhältnis Acrylamid:N,N'-Methylenbisacrylamid 37,5:1 (Roth)

cDNA	3,0 µl
Uni-ZAP XR Vektor (1 µg/µl)	1,0 µl
rATP (10 mM)	0,5 µl
Ligationspuffer (10x)	0,5 µl
T4-DNA Ligase (4 U/µl)	0,5 µl

Nach Inkubation der Reaktion üN bei 12 °C wurde die in den Vektor ligierte cDNA mit Hilfe des Gigapack[®] III Gold Packaging Extract (Stratagene) in Phagenköpfe verpackt. Zu den Bakteriophagen mit einem Volumen von 30 µl wurden 500 µl SM-Puffer und 20 µl Chloroform gegeben, zentrifugiert und die Phagen bis zur Bestimmung ihres Titers und der Amplifizierung (s. II.2.3.14.4) bei 4 °C gelagert.

II.2.3.14.4 Titerbestimmung, Amplifizierung und Ausplattieren der cDNA-Bank

Zur Infektion von Bakterien benötigt der Bakteriophage λ deren Maltoserezeptor. Die Expression dieses Rezeptors wird erreicht, indem man den *E. coli*-Stamm XL1-Blue MRF' bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 bei 37 °C in einem LB-Medium anzieht, das zusätzlich 10 mM MgSO₄ und 0,2 % (w/v) Maltose enthält. Die Zellen wurden nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 500 g in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und auf eine OD₆₀₀ von 0,5 verdünnt. Zur Titerbestimmung der cDNA-Bank wurde zu 200 µl der vorbereiteten Bakterien 1 µl der verpackten Phagen gegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 37 °C wurde die Phagen-Bakterienmischung zu 4 ml flüssigem (45 °C) NZY-Topagar pipettiert und auf vorgewärmte (37 °C) NZY-Agarplatten gegossen. Nach Erstarren des Topagars wurden die Platten 8 bis 10 h bei 37 °C zur Ausbildung der Phagenplaques inkubiert.

Eine Plattierung der Primärbank mit IPTG- und X-Gal-haltigem Topagar ermöglichte das Verhältnis zwischen Phagen mit und ohne cDNA-Insert zu bestimmen. Letztere haben ein intaktes lacZ-Gen, die Plaques erscheinen blau im Gegensatz zu den transparenten Plaques der Phagen mit Insert.

Zur Amplifizierung der Bank wurden 21 µl der Primärbank zu 300 µl der wie oben beschrieben vorbereiteten XL1-Blue MRF'-Zellen gegeben und wie beschrieben auf NZY-Platten ausplattiert. Nach der Inkubation von 8 h bei 37 °C wurden 8 ml SM-Puffer auf die Platten gegeben und unter leichtem Schütteln (30 rpm) üN bei 4 °C inkubiert. Auf diese Weise diffundieren die Phagen in den SM-Puffer. Geerntet wurden die Phagen durch Dekantieren in 50 ml-Zentrifugenröhrchen. Bakterienbestandteile wurden durch das Zusetzen von 5 % Chloroform und 15-minütiges Zentrifugieren bei 500 g und RT entfernt. Der oberen wässrigen Phase wurde zur Konservierung erneut Chloroform in der Endkonzentration 0,3 % zugefügt und Aliquots zur längeren Lagerung bei -80 °C eingefroren. Der Titer der amplifizierten Bank wurde in den Verdünnungen 1:1.000, 1:10.000 und 1:100.000 bestimmt. Verdünnt wurde mit SM-Puffer.

Für das Screenen der cDNA-Bank wurde das Phagenlysat so verdünnt, dass sich nicht mehr als 25.000 Plaques auf einer 92 mm-Agarplatte befanden. Für die sekundäre Plaque-Hybridisierung wurden nicht mehr als 500 Plaques pro Platte, für die tertiäre Hybridisierung nicht mehr als 100 Plaques wie oben beschrieben ausplatziert.

II.2.3.14.5 Screening der cDNA-Bank

Plaque-Filterabdruck

Zur *in situ*-Hybridisierung (BENTON & DAVIS, 1977) wurden die Phagenplaques auf Nylonmembranen (Biodyne A Transfer Membrane, Pall Filtron, Dreieich) übertragen. Auf die mindestens 1 h lang bei 4 °C gekühlten Platten wurde 2 min lang die Membran aufgelegt und durch drei asymmetrische Stiche mit einer Kanüle markiert. Bei der primären Plaque-Hybridisierung wurden Membranduplikate zur besseren Identifizierung positiver Signale angefertigt, die 4 min lang auf die Platte gelegt wurden. Die Membranen wurden 1 min lang an der Luft getrocknet und dann mit dem Rücken für 4 min auf mit Denaturierungslösung getränktes Whatman 3MM CHR (Helolab, Wiesloch) gelegt. Danach folgte eine 8-minütige Inkubation auf mit Neutralisierungslösung getränktem Whatman 3MM CHR, bevor die Membranen mit 2xSSC gewaschen wurden. Die DNA wurde nach kurzem Trocknen an der Luft durch 2-stündiges „Backen“ bei 80 °C auf den Membranen fixiert.

Denaturierungslösung:	NaCl	1,5 M
	NaOH	0,5 M
Neutralisierungslösung:	NaCl	1,5 M
	Tris/HCl pH 7,5	1,0 M

Plaque-Hybridisierung

Die Plaque-Hybridisierung wurde mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde (s. II.2.3.15.5) durchgeführt. Je 10 Nylonmembranen wurden in ca. 15 ml Prähybridisierungspuffer bei 42 °C in einem Hybridisierungssofen (Bachhofer) mindestens 4 h lang vorinkubiert. Die Hybridisierung mit der ³²P-markierten, hitzedenaturierten Sonde fand ebenfalls bei 42 °C statt. Um nicht gebundene Sonden-DNA zu entfernen, wurde anschließend je zweimal 30 min lang mit Waschpuffer 1 und dann mit Waschpuffer 2 bei RT gewaschen. Die Membranen wurden dann mit Frischhaltefolie abgedeckt und in Röntgenkassetten (30 x 40 cm, CAWO) auf einen Röntgenfilm (Hyperfilm: RPN7H, Amersham Pharmacia Biotech) gelegt. Zur Detektion der Hybridisierungssignale wurde ein aufgelegter Röntgenfilm bei -80 °C ca. 20 h exponiert. Anhand der asymmetrischen Markierung, die auf das Radioautogramm übertragen wurde, konnten Hybridisierungssignale mit Phagenplaques auf der Platte zur Deckung gebracht werden. Diese wurden dann bei den ersten zwei Hybridisierungen mit dem dicken Ende einer Pasteurpipette, bei isolierten Plaques der dritten Hybridi-

sierung mit dem dünnen Ende einer Pasteurpipette ausgestochen und in 500 µl SM-Puffer mit 0,04 % Chloroform gegeben. Die Phagen diffundierten entweder 2 h lang bei RT oder üN bei 4 °C in den Puffer, wurden dann entsprechend verdünnt (vgl. II.2.3.14.4) und wieder ausplattiert oder das Phagemid eines isolierten Plaques ausgeschnitten (s. II.2.3.14.6).

Prähybridisierungslösung:	Dextransulfat (Roth)	10 % (w/v)
	NaCl	1,0 M
	SDS	1 %
	Formamid	30 % (v/v)
	Blockier-DNA ¹⁶	100 µg/ml
Waschlösung 1:	SSC	2x
	SDS	0,5 %
Waschlösung 2:	SSC	0,5x
	SDS	0,1 %

II.2.3.14.6 *In vivo*-Excision des Phagemids pBluescript[®] aus λ-Uni-ZAP XR

Das Uni-ZAP XR-Vektorsystem kombiniert die hohe Effizienz der cDNA-Bank-Konstruktion in einem λ-Phagen und die einfache Handhabung eines Plasmids, des Phagemids pBluescript[®]. Für die *in vivo*-Excision wurden *E. coli* XL1-Blue MRF' und *E. coli* SOLR wie unter II.2.3.12.5 beschrieben mit MgSO₄ und Maltose angezogen und in 10 mM MgSO₄ aufgenommen. Zu 200 µl *E. coli* XL1-Blue MRF' wurden in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen 250 µl Phagenlösung (mit >1 x 10⁵ Phagenpartikeln) eines isolierten Plaques (s. II.2.3.14.5) und 1 µl des Helferphagen ExAssist (>1 x 10⁶ pfu/µl) gegeben und 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 3 ml LB-Medium hinzugefügt und weitere 2,5 bis 3 h bei 37 °C auf einem Rotationsschüttler (250 rpm) inkubiert. Nach einem 20-minütigen Erhitzen auf 70 °C wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Diese Stammlösung enthält das ausgeschnittene pBluescript[®]-Phagemid in filamentöse Phagenpartikel verpackt und kann bei 4 °C bis zu 2 Monate gelagert werden. Zur Plasmidgewinnung wurden 1-10 µl der Phagenstammlösung zu 200 µl *E. coli* SOLR gegeben und 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf LB_{Amp}-Agarplatten (50 µg/ml) ausplattiert und üN bei 37 °C inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde isoliert, durch Restriktionsverdau untersucht und sequenziert (II.2.3.6 bzw. II.2.3.10).

II.2.3.15 Northernblot-Analyse

II.2.3.15.1 Isolierung von Gesamt-RNA

0,5 g des gewünschten Gewebes (Blätter oder Körner) wurde unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver entweder mit der Hand gemörsert oder in der Ku-

¹⁶ hitzedenaturiert, s. II.2.3.1

gelmühle (Retsch GmbH & Co. KG) zerkleinert und in 13 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 5 ml PCI und 5 ml Extraktionspuffer wurde die Suspension 10 min lang bei 2550 g und RT zur Phasentrennung zentrifugiert. Die RNA-haltige wässrige Phase wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, mit 1 Volumen CI versetzt, erneut zentrifugiert und wieder die wässrige Phase abgenommen. Diese wurde mit 1 Volumen Isopropanol gemischt, 20 min lang in flüssigem Stickstoff gefroren und die gefällte RNA nach dem Auftauen 30 min bei 4.500 g und 4 °C pelletiert. Der Niederschlag wurde getrocknet, danach in 200 bis 400 µl DEPC-H₂O gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt. Die bis hier beschriebene Methode dient der Anreicherung von RNA. Zur Aufreinigung wurden ca. 100 µg der RNA in dem "Plant RNeasy Total RNA Purification Kit" (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers eingesetzt. Die RNA wurde von der Säule zweimal mit jeweils 30 µl DEPC-H₂O eluiert. Die Konzentration wurde in 3-fach Messungen bestimmt und die RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

Extraktionspuffer:	Tris/HCl pH 7,5	50 mM
	LiCl	100 mM
	EDTA	5 mM
	SDS	1 %

II.2.3.15.2 Denaturierende Agarosegelelektrophorese von RNA

Die elektrophoretische Trennung von RNA wurde in der Flachbettgelkammer EasyCast™ B2 mit einer Gelgröße von 12 x 14 cm (OWL Separation Systems) bei RT durchgeführt. Das Gel enthielt:

Agarose (NEEO, Roth)	1 %
MOPS-Puffer	1x
Formaldehyd (37 % v/v)	3 %
EtBr	0,15 µg/ml

Die Agarose wurde in DEPC-Wasser aufgekocht, auf ca. 55 °C abgekühlt, dann die weiteren Komponenten zugegeben und in die Gelkammer gegossen. Für die Gelbeladung wurden 10 µg RNA in einem Volumen von höchstens 5,6 µl mit 2,5 µl 10xMOPS, 4,4 µl 37 %igem (v/v) Formaldehyd und 12,5 µl Formamid gemischt, 15 min bei 65 °C denaturiert und nach dem Abkühlen im Eisbad 4 µl 6x-Auftragspuffer (Loading Dye, MBI Fermentas) hinzugefügt. Die Elektrophorese erfolgte, nach 10minütigem Vorlauf vor der Gelbeladung, 3 h lang bei 5 V/cm in 1-fach konzentriertem MOPS.

II.2.3.15.3 Transfer von RNA auf Nylonmembranen (Northern blot)

Die Übertragung der im Agarosegel aufgetrennten RNA auf eine Nylonmembran (Hybond™-N, Amersham) erfolgte durch Kapillarkräfte nach der von CHOMCZYNSKI (1992) beschriebenen Methode des „downward alkaline capillary transfer“. Die Nylonmembran wurde vor dem Transfer 30 min lang in A. bidest inkubiert. Dann wurde

die Membran auf in Transferpuffer getränktes Whatman 3MM CHR-Papier (Herolab) gelegt, das auf einem Stapel saugfähigem Papier lag. Auf die Membran wurde das Gel gelegt und wieder getränktes Whatman 3MM CHR-Papier, sowie eine Verbindung zum Transferpuffer-Reservoir, ebenfalls aus getränktem Whatman 3MM CHR-Papier. Die Dauer der Übertragung betrug 105 min. Danach wurde die Membran 20 min lang in Neutralisierungslösung inkubiert und anschließend bei 80 °C 20 min lang gebacken. Bis zur Verwendung wurde die Membran bei RT trocken gelagert.

Transferpuffer:	NaCl	3 M
	NaOH	8 mM
Neutralisierungslösung:	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ pH 6,8	200 mM

II.2.3.15.4 Hybridisierung und Radioautographie

Die Hybridisierung von Northernblots erfolgte wie die Plaque-Hybridisierung (s. II.2.3.14.5). Verändert wurde nur die Temperatur der Waschlösung, die je nach eingesetzter Sonden-DNA zwischen 25 °C und 65 °C lag. Die Radioautographie wurde ebenfalls wie unter II.2.3.14.5 beschrieben durchgeführt. Variiert wurde hier die Expositionsszeit, die je nach Intensität des Signals zwischen 12 und 144 h lag.

II.2.3.15.5 Markierung der DNA-Sonden

Für die Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden wurden die aus einem Gel eluierten DNA-Fragmente (s. II.2.3.7) mit Hilfe des "High Prime Kit" (Roche, Mannheim) gemäß den Angaben des Herstellers mit [α -³²P]-dCTP (Easytides™, 50 mCi/ml, NEN-DuPont) markiert. Als Sonde wurden 25 bis 50 ng DNA eingesetzt. Nicht inkorporierte Nukleotide wurden mit "Quick Spin™ Columns" (Roche) nach Anleitung entfernt.

II.2.4 Proteinchemische Methoden

II.2.4.1 Herstellung von Proteinextrakten

II.2.4.1.1 Extraktion von Protein aus Weizenblättern

Frische oder bei -80 °C gefrorene Weizenblätter wurden in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser zu einem feinen Pulver zerrieben. Dieses wurde in 2 ml Extraktionspuffer je g Blattmaterial suspendiert und unter Rühren aufgetaut. Nach der Filtration durch 4 Lagen Verbandsmull und 1 Lage Miracloth (Calbiochem) wurde die Suspension bei 15.000 g und 4 °C 20 min lang zentrifugiert. Der Überstand wird im folgenden als **Rohextrakt** bezeichnet. Kleinere Mengen an Blattmaterial wurden 20 min lang in der Tischzentrifuge bei 13.000 g zentrifugiert.

Extraktionspuffer:	Tris/Acetat pH 7,8	0,1 M
	CaCl ₂	2 mM
	MgCl ₂	5 mM
	2-Mercaptoethanol	28 mM

Zur Anreicherung der Phosphorylase wurde der Rohextrakt zunächst mit 5 % PEG (Polyethylenglycol 8000, Sigma) versetzt, 30 min auf Eis gerührt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Die PEG-Konzentration im Überstand wurde auf 30 % erhöht, die Suspension wiederum nach 30-minütigem Rühren wie oben beschrieben zentrifugiert und der Niederschlag in 0,2 ml 20 mM Tris/Acetat pH 7,5 pro ml des ursprünglichen Volumens resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde dieses Konzentrat üN bei 4 °C gegen 20 mM Tris/Acetat pH 7,5 dialysiert und als **P30** bezeichnet.

II.2.4.1.2 Extraktion von Protein aus Weizenkörnern

Körner in gefrorenem Zustand wurden mit Hilfe einer Kugelmühle zu einem feinen Pulver verarbeitet. Je g Kornmaterial wurde 3 ml Extraktionspuffer (s. o.) zugefügt und die Suspension nach dem Auftauen 10 min lang in der Tischzentrifuge bei 13.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde weiterverwendet oder bei –80 °C eingefroren.

II.2.4.1.3 Aufschluss von *E. coli*-Zellen

Lyse unter nicht-denaturierenden Bedingungen

Die, wie unter II.2.2.4 beschrieben, angezogenen Bakterien wurden in Lysis-Puffer resuspendiert (3 ml je g Naßgewicht) und 1 mg/ml Lysozym zugegeben. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis wurde das Lysat 30 min lang bei 4 °C und 10.000 g zentrifugiert. Auf eine Ultraschallbehandlung wurde verzichtet, da sie keine Verbesserung des Aufschlusses brachte. Der Überstand wurde analysiert.

Lysis-Puffer:	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄	50 mM
	Imidazol/NaOH pH 8,0	10 mM
	NaCl	300 mM

Lyse unter denaturierenden Bedingungen

Im denaturierenden Aufschluss wurden die Bakterien aus II.2.2.4 in 5 ml Aufschlusspuffer je g Nassgewicht resuspendiert. Nach 1 h Rühren bei RT wurde das Lysat bei RT und 10.000 g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde analysiert.

Aufschlusspuffer:	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄	100 mM
	Tris/HCl pH 8,0	10 mM
	Harnstoff	8 M

II.2.4.2 Säulenchromatographische Verfahren

II.2.4.2.1 Affinitätschromatographie an Cycloheptaamylose

Die Reinigung der cytosolischen Phosphorylasen erfolgte über eine Affinitätschromatographie mit Cycloheptaamylose. Dafür wurde nach der Vorschrift von VRETBLAD (1974) die Cycloheptaamylose kovalent an epoxy-aktivierte Sepharose 6B

(Sigma) gebunden. Die Säule mit einem Volumen von 15 ml wurde vor dem Lauf mit dem 10-fachen Säulenvolumen an 20 mM Tris/Acetat pH 7,5, bei einer Flussgeschwindigkeit von 1,0 ml/min (Peristaltische Pumpe "Pump P-1", Pharmacia) gewaschen und der Proteinextrakt P30 (vgl. II.2.4.1.1) bei der halben Geschwindigkeit (0,5 ml/min) aufgetragen. Die Proteinkonzentration wurde während des Laufs mit der Durchflusszelle einer FPLC-Anlage (Pharmacia) bei 280 nm verfolgt und mit einem Schreiber aufgezeichnet. Der Durchlauf enthielt neben vielen anderen Proteinen die plastidische Phosphorylase und wurde bei -20 °C aufgehoben. Die Säule wurde so lange mit obigem Puffer gewaschen, bis sich die Proteinkonzentration konstant um den Nullwert bewegte. Die Elution erfolgte mit 5 mg Cycloheptaamylose/ml 20 mM Tris/HCl pH 7,5 weiterhin bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. Proteinhaltige Fraktionen wurden je nach Verwendungszweck in 1 ml-Aliquoten gesammelt oder vereinigt und wie unter II.2.4.3 beschrieben eingeengt und entsalzt. Nach der Elution wurde die Säule für mehrere Stunden mit 20 mM Tris/Acetat pH 7,5 gewaschen. Nach jeder dritten Nutzung wurde sie mit 4 M Harnstoff in 20 mM Tris/Acetat pH 7,5 gereinigt und anschließend mit dem Puffer ohne Harnstoff äquilibriert. Zur Lagerung bei 4 °C wurde dem Puffer 0,04 % Na-Azid zugesetzt.

II.2.4.2.2 Rechromatographie an Cycloheptaamylose

Die Abtrennung der letzten verunreinigenden Proteine von der cytosolischen Phosphorylase im Eluat der Cycloheptaamylose-Affinitätssäule gelang durch eine Rechromatographie an Cycloheptaamylose. Dafür wurde das Eluat der Affinitätssäule aus II.2.4.2.1 über eine Sephadex™ G-25 Säule (NAP™ Columns, Pharmacia) entsalzt und wieder in 20 mM Tris/Acetat pH 7,5 aufgenommen. Das Protein wurde auf eine 2 ml-Cycloheptaamylosesäule gegeben und der Durchlauf, der die Phosphorylase enthielt, gesammelt. Die Säule wurde gewaschen, bis die Extinktion sich dem Nullpunkt näherte. Die Elution erfolgte mit einem 15 ml umfassenden linearen Gradienten von 0 bis 5 mg Cycloheptaamylose/ml 20 mM Tris/Acetat pH 7,5. Das Eluat wurde in 1 ml-Fractionen gesammelt, konzentriert (s. II.2.4.3) und analysiert.

II.2.4.2.3 Chromatographien zur Reinigung der plastidischen Phosphorylase

Affinitätschromatographien

Für den Versuch, die plastidische Phosphorylase zu reinigen, wurden nach der Vorschrift von VRETBLAD (1974) folgende Substanzen an 1 g epoxy-aktivierte Sepharose 6B gekoppelt:

- lösliche Stärke (nach Zulkowsky, Serva)
- Kartoffelstärke (Fluka)
- Amylopektin (Sigma)
- Glycogen (Type II From Oyster, Sigma)

Dextrin 10¹⁷
Maltotriose
Maltotetraose
Maltopentaose
Maltohexaose
Maltoheptaose

} (Sigma)

Auf die jeweilige Säule wurde der Durchlauf der Cycloheptaamylosesäule gegeben. Der Laufpuffer war entweder 50 mM Tris/HCl pH 8,8 (Amylopektin), 50 mM Tris/Acetate pH 7,5 (Dextrin 10 und Kartoffelstärke) oder bei allen anderen Säulen 20 mM Tris/Acetate pH 7,5. Der Durchlauf wurde gesammelt, die Säule gewaschen und in den meisten Fällen mit 5 % Dextrin 10 eluiert. Die Glycogen- und Cycloheptaamylosesäulen bildeten eine Ausnahme, sie wurden entweder mit 5 mg/ml Glycogen oder Cycloheptaamylose eluiert.

Zusätzlich wurde die Bindung des Proteins an Amylose Resin (New England Biolabs) getestet. Hier war der Laufpuffer 500 mM Citrat pH 6,0. Eluiert wurde mit 500 mM Citrat pH 6,0, 50 mM Tris und 5 % Dextrin 10.

Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose

Eine FPLC-Säule (Pharmacia) mit einem Volumen von 1 ml wurde mit dem stark basischen Anionenaustauscher (Q-Sepharose HP[®]) bepackt. Zur Äquilibration der Säule wurde diese für ca. eine Stunde mit 20 mM Tris/Acetate pH 7,5 gewaschen. 3 ml des Durchlaufs der Cycloheptaamylosesäule (s. II.2.4.2.1) wurden auf die Säule aufgetragen. Vom Zeitpunkt des Auftrags an wurde die Proteinkonzentration mittels einer Durchflusszelle bei 280 nm aufgezeichnet. Der Durchlauf wurde gesammelt und die Säule solange mit obigem Puffer nachgewaschen, bis sich die Extinktion nicht mehr änderte. Danach erfolgte die Elution mit einem 40-minütigen zweiphasigen Salzgradienten von 0-1 M NaCl in 20 mM Tris/Acetate pH 7,5. Das Eluat wurde in Fraktionen von 1 ml gesammelt und analysiert.

Hydrophobe Interaktionschromatographie

Es wurde die Bindung der plastidischen Phosphorylase an mehrere 1 ml-Säulen (Phenyl Sepharose 6 Fast Flow, Butyl Sepharose 4 Fast Flow und Octyl Sepharose 4 Fast Flow) des HiTrap[™]HIC Test Kit (Pharmacia) gemäß den Angaben des Herstellers getestet.

Kombination von Anionenaustauschchromatographie und Hydrophober Interaktionschromatographie

Der Durchlauf der Cycloheptaamylose-Säule wurde, wie oben beschrieben, auf eine Anionenaustauscher-Säule (Q-Sepharose HP[®], Pharmacia Biotech) aufgetra-

¹⁷ D10 (Serva); eine 10 %ige Lösung wurde mit dem 3-fachen Volumen an Ethanol versetzt, üN bei 4 °C inkubiert, zentrifugiert (10 min, 2500 g, 4 °C), der Überstand in einem Rotationsverdampfer fast zum Pulver eingedunstet und dieses mit A. bidest auf das anfängliche Volumen der 10 %igen Lösung ergänzt

gen. Die Fraktionen, welche die plastidische Form enthielten, wurden entsalzt, in 20 mM Phosphatpuffer pH 7,0 mit 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aufgenommen und auf die Hydrophobe-Interaktions-Säule Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub) gegeben. Eluiert wurde mit dem Phosphatpuffer ohne Salz.

II.2.4.3 Entsatzung, Konzentrierung und Lagerung von Proben

Zur Umpufferung, Entfernung von störenden Salzen oder dem Inhibitor Cycloheptaamylose wurden Elutionsfraktionen durch Gelfiltration über NAPTM10- oder NAPTM5-Säulen, die Sephadex G-25 enthalten, nach Angaben des Herstellers behandelt.

Das Volumen der Proben wurde durch Ultrafiltration verringert. Hierzu wurden je nach Ausgangsvolumen NanosepTM 10 oder 30 oder MicrosepTM 10 oder 30 (Pall Gelman Sciences) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

Die kurzfristige Lagerung von proteinhaltigen Proben während ihrer Aufarbeitung erfolgte bei 0 °C in einem Eisbad. Für eine längere Lagerung bei -20 °C wurde den Proben 0,5 g Glycerin/ml hinzugefügt.

II.2.4.4 Polyacrylamidgelelektrophoresen (PAGE)

Die Elektrophoresen wurden in einem vertikalen Gelsystem von Biometra durchgeführt. Die Größe der Gele betrug im Minigelsystem 8,5 cm (Breite) x 7,5 cm (Höhe) x 0,1 cm (Dicke) und im Multigel Long-System 11,0 cm x 11,5 cm x 0,1 cm. Für die Herstellung der Gele wurde eine Stammlösung aus 30 % (w/v) Acrylamid und 0,8 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid (Rotiphorese[®] Gel 30, Roth) verwendet.

II.2.4.4.1 Analytische PAGE zum Nachweis von Phosphorylaseaktivität

Bei der nicht-denaturierenden Elektrophorese hängt die Trennung der Proteine von ihrer Nettoladung, Molekülmasse, Form und Affinität zu dem in das Gel einpolymerisierten Substrat ab. Nach der PAGE konnten die Phosphorylase-Formen anhand ihrer stärke-synthetisierenden Aktivität nachgewiesen werden.

Die Zusammensetzung des Zweikomponentengels ist **Tabelle 4** zu entnehmen. Das Trenngel wurde zwischen die Glasplatten der Gelapparatur des Minigelsystems gegossen, mit 50 %igem Isopropanol überschichtet und polymerisierte ca. 1 h lang. Auf das auspolymerisierte Gel wurde das Sammelgel gegossen. Ein in das Sammelgel eingeführter 10-zähniger Kamm bildete Aussparungen in der Matrix, die als Auftragsaschen für die Proben dienten. In diese Taschen wurden 10 bis 20 µl der mit Bromphenolblau (BPB)-Auftragspuffer versetzten Proben gegeben. Die Elektrophorese erfolgte mit dem Laufpuffer 192 mM Glycin, 25 mM Tris pH 8,3 bei 4 °C zunächst bei 50 V. Sobald die BPB-Front in das Trenngel eindrang wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die BPB-Front das Gelende erreicht hatte.

Tabelle 4: Zusammensetzung eines nicht-denaturierenden Gels mit Glycogen

	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid	7,5 % (w/v)	3 % (w/v)
Tris/HCl pH 8,8	375 mM	-
Tris/HCl pH 6,8	-	62,5 mM
Glycogen ¹⁸	0,1 % (w/v)	-
APS	0,03 % (w/v)	0,03 % (w/v)
TEMED ¹⁹	0,025 % (v/v)	0,05 % (v/v)

Nach der Elektrophorese wurden die Trenngele zunächst 30 min in 0,1 M Na-Citrat pH 6,5 und 14 mM 2-Mercaptoethanol äquilibriert. Dann wurden sie üN bei 30 bis 37 °C im gleichen Puffer mit zugesetzten 0,75 % G1P als Substrat inkubiert. Das im Gel enthaltene Glycogen diente dabei als Primer der Stärkesynthese. Anschließend wurde das Gel zweimal mit A. bidest gewaschen und dann mit einer Iod/Kaliumiodidlösung (0,13 %/0,3 % (w/v) in A. bidest) angefärbt. Die von den Phosphorylasen gebildete Stärke ist als blauviolette Färbung gegen den hellen Hintergrund des Gels zu erkennen.

BPB-Auftragspuffer:	Tris/Acetat pH 7,5	50 mM
	Glycerin	50 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,025 % (w/v)
	2-Mercaptoethanol	14 mM

II.2.4.4.2 Denaturierende PAGE

Das Natriumdodecylsulfat (SDS) in einem denaturierenden Gel bewirkt, dass die meisten Proteine ausschließlich aufgrund ihrer Masse aufgetrennt werden. Zum Vergleich der Molekülmassen wurden folgende Markerproteinmischungen verwendet:

High Molecular Weight Standard Mixture (SDS-6H, Sigma)
 Low Molecular Weight Standard Mixture (SDS-17S, Sigma)
 BioRad SilverStain SDS-PAGE Standard High Range (BioRad, Hamburg)
 High Molecular Weight Standard (Boehringer, Mannheim)

SDS-PAGE nach LAEMMLI (1970)

Dieses Gel bestand wie das nicht-denaturierende Gel (II.2.4.4.1) aus einem alkalischen Trenngel und einem nahezu neutralen Sammelgel. Je nach Fragestellung wurde das Mini- oder das Multigelsystem verwendet. Die Zusammensetzung der Gele zeigt **Tabelle 5**. Die Acrylamidkonzentration variierte je nach Verwendungszweck zwischen 7,5, 10 und 12,5 %.

¹⁸ Type II From Oyster (Sigma)

¹⁹ Zugabe nach Entgasen der Gellösung

Tabelle 5: Zusammensetzung der Gelmatrix eines denaturierenden Gels

	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid	7,5, 10, 12,5 % (w/v)	3 % (w/v)
Tris/HCl pH 8,8	375 mM	-
Tris/HCl pH 6,8	-	125 mM
APS	0,03 % (w/v)	0,03 % (w/v)
SDS ¹⁹	0,1% (w/v)	0,1 % (w/v)
TEMED ¹⁹	0,025 % (v/v)	0,05 % (v/v)

Die Proben wurden mit 1 Volumen 2-fach konzentriertem SDS-Auftragspuffer versetzt und 5 min lang auf 100 °C erhitzt. Der Elektrophoreselauf fand bei 4 °C mit einem Laufpuffer aus 192 mM Glycin, 25 mM Tris pH 8,3 und 0,1 % SDS statt. Die Anfangsspannung betrug für ein Minigel 50 V, für ein Multigel 80 V und wurde nach Eindringen der BPB-Front in das Trenngel auf 150 bzw. 200 V erhöht, bis die Farbfront das Gelende erreicht hatte.

SDS-Auftragspuffer:	Tris/HCl pH 6,8	125 mM
	Glycerin	20 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,05 % (w/v)
	SDS	1,0 % (w/v)
	2-Mercaptoethanol	14 mM

Nach dem Lauf wurden die Proteine im Gel entweder mit Coomassie-Blau oder Silbernitrat gefärbt (s. u.) oder auf eine Membran transferiert (vgl. II.2.4.5).

Tris-Tricin-Gelsystem

Für die elektrophoretische Auftrennung von Peptiden nach chemischer Spaltung (s. II.2.5.1.2) wurde das aus drei Schichten bestehende Gelsystem von SCHÄGGER & VON JAGOW (1987) verwendet. Das in das Multigelsystem gegossene Trenngel maß ca. 6,5 cm, das "Spacergel" ca. 2,5 cm und die Sammelgelstrecke ca. 2 cm. Die Gelzusammensetzung ist Tabelle 6 zu entnehmen. Die Probenvorbereitung entsprach derjenigen für das Gel im Laemmli-System. Der Lauf erfolgte mit 2 verschiedenen Puffern, einem Anoden- und einem Kathodenpuffer bei 4 °C. Zunächst wurde für 1 h eine Spannung von 30 V angelegt und dann für 15-18 h auf 90 V erhöht. Die Peptide im Gel wurden nach dem Lauf entweder mit Coomassie-Blau oder Silbernitrat gefärbt (s. u.).

Tabelle 6: Komponenten des Tris-Tricine-Gelsystems

	Trenngel	"Spacergel"	Sammelgel
Acrylamid	16,5 % (w/v)	10 % (w/v)	4 % (w/v)
Tris/HCl pH 8,45	1,0 M	1,0 M	0,75 M
SDS	0,1% (w/v)	0,1% (w/v)	0,075 % (w/v)
Glycerin	13,3 % (w/v)	-	-
APS	0,05 % (w/v)	0,03 % (w/v)	0,08 % (w/v)
TEMED	0,05 % (v/v)	0,03 % (v/v)	0,08 % (v/v)

Anodenpuffer:	Tris/HCl pH 8,9	200 mM
Kathodenpuffer:	Tris	100 mM
	Tricine	100 mM
	SDS	0,1 % (w/v)

Färbung mit Coomassie-Blau

Das Gel wurde mindestens 30 min lang in der Färbelösung aus 0,2 % (w/v) Serva Blue R 250, 0,05 % (w/v) Serva Blue G 250, 42,5 % (v/v) Ethanol, 5,0 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure gefärbt. Zur Entfärbung des Hintergrundes wurde das Gel zunächst 30 min in starkem Entfärber (40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure) geschüttelt und dann durch mehrmaliges Wechseln des schwachen Entfärbers (5,0 % (v/v) Methanol, 7,5 % (v/v) Essigsäure) entfärbt. Die Aufbewahrung erfolgte in dem schwachen Entfärber.

Silbernitratfärbung

Eine empfindlichere Detektion von Proteinbanden ist mit der Silberfärbung möglich. Die Gele wurden nach der Methode von HEUKESHOVEN & DERNICK (1985), deren Durchführung in WESTERMEIER (1990) beschrieben ist, mit Silbernitrat angefärbt. Aufbewahrt wurden die Gele in 30 % (w/v) Glycerin.

II.2.4.4.3 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) trennt Proteine aufgrund ihrer Nettoladung. Die Proteine wandern im elektrischen Feld entlang eines pH-Gradienten so weit, bis sie ihren isoelektrischen Punkt erreicht haben, an dem ihre Nettoladung gleich null ist und damit auch ihre Wanderungsgeschwindigkeit.

Die IEF wurde mit der Multigelapparatur von Biometra durchgeführt, die Zusammensetzung des Gels zeigt **Tabelle 7**. Die Proben wurden mit dem gleichen Volumen an IEF-Auftragspuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Fokussierung erfolgte mit 25 mM NaOH als Kathodenpuffer und 20 mM Essigsäure als Anodenpuffer zunächst 90 min bei 200 V und RT, dann für weitere 90 min bei 400 V. Nach dem Lauf wurden die Proteine entweder mit Silbernitrat gefärbt (s. II.2.4.4.2) oder einer Aktivitätsfärbung unterzogen (vgl. II.2.4.4.1).

Tabelle 7: Zusammensetzung des Gels für die isoelektrische Fokussierung

IEF-Gel		
	Acrylamid	5 % (w/v)
	Servalyt 4-6	4 % (w/v)
	Servalyt 4-9T	1 % (w/v)
	Glycerin	10 % (w/v)
	APS	0,05 % (w/v)
	TEMED ¹⁹	0,17 % (v/v)
IEF-Auftragspuffer:	Glycerin	60 % (v/v)
	Servalyt 4-6	4 % (v/v)

II.2.4.5 Westernblot

Als Blotten oder Westernblot bezeichnet man die Methode mit der Proteine aus einer Polyacrylamidmatrix auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes transferiert und immobilisiert werden.

Folgte dem Blotten ein immunologischer Nachweis oder eine Spaltung der Proteine, so wurde das Semidry-Verfahren, modifiziert nach KYHSE-ANDERSEN (1984), angewendet. Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran (Immobilon™-P, Millipore oder FluoroTrans, Pall) transferiert, die zuvor 3 s in Methanol inkubiert worden war, um sie mit Wasser benetzen zu können. Verwendet wurde eine MultiphorII-Elektrophoresekammer mit Graphitelektroden (Pharmacia). Als Reservoir für den Transferpuffer diente Whatman 3MM CHR-Papier. Geblottet wurde 1,75 h bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$. Die Proteinbanden wurden anschließend mit PonceauS-Lösung (Serva) angefärbt, die Positionen der Standardproteine angezeichnet und dann die Färbung mit A. bidest wieder ausgewaschen.

Transferpuffer:	Tris	48 mM
	Glycin	39 mM
	SDS	0,037 % (w/v)
	Methanol	10,0 % (v/v)

Zur N-terminalen Ansequenzierung und zur Ansequenzierung der Spaltstücke der BNPS-Spaltung wurde das Protein unter Verwendung des bei KHYSE-ANDERSEN (1984) angegebenen, diskontinuierlichen Puffersystems im Labor von Dr. Faulhammer (Lehrstuhl für Biochemie I, Universität Bayreuth) auf die PVDF-Membran ProBlott (Applied Biosystems) übertragen. Der Transfer erfolgte unter Verwendung von Whatman 17 CHR-Papier ca. 2 h lang bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ in einer Trans Blot SD Zelle (Bio-Rad).

Anodenlösung 1:	Tris	300 mM
	Methanol	20 % (v/v)
Anodenlösung 2:	Tris	25 mM
	Methanol	20 % (v/v)
Transferpuffer:	6-Aminohexansäure	48 mM
	SDS	0,01 % (w/v)
	Methanol	20 % (v/v)
Färbelösung:	Amidoschwarz 10B	0,1 % (w/v)
	Methanol	20 % (v/v)
	Eisessig	10 % (v/v)
Entfärber:	Methanol	90 % (v/v)
	Eisessig	2 % (v/v)

Nach dem Transfer wurden die Proteine 2-4 min lang mit der Färbelösung gefärbt, 10 min lang entfärbt und die Membran dann an der Luft getrocknet.

II.2.5 Analytische Methoden

II.2.5.1 Proteinanalytik

II.2.5.1.1 Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen wurden verändert nach BRADFORD (1976) durchgeführt. Dafür wurden in einer Mikrotiterplatte (Nunc) 25 µl des käuflichen Bradford-Reagenz "Bio-Rad Protein Assay" (Bio-Rad) vorgelegt und mit der Probe in einem Volumen von 100 µl gemischt. Die Absorption wurde mit einem Elisa-Reader (Power Wave_x340, BIO-TEK Instruments Inc.) bei 620 nm gemessen. Eine Eichkurve wurde mit einer BSA-Stammlösung von Sigma mit optisch eingestellter Konzentration erstellt.

II.2.5.1.2 Proteinspaltung

Durch enzymatischen Verdau oder chemische Spaltung eines Proteins erhält man ein typisches Spaltmuster, das mit anderen Spaltmustern verglichen werden kann. Anhand des Musters können Aussagen über die Ähnlichkeit von Proteinen getroffen werden.

Trypsinverdau im Gel

Nach der SDS-Elektrophorese (vgl. II.2.4.4.2) wurde das Gel 10 min lang mit Coomassie gefärbt und nach einer kurzen Inkubation in starkem Entfärber die zu spaltenden Banden ausgeschnitten. Diese wurden 60 min lang mit A. bidest gewaschen und danach 30 min lang in einer Speedvac (RC 10.10., Jouan) getrocknet. Zu den trockenen Gelstücken wurden 200 µl Trypsinmischung gegeben. Nach 90 min Inkubation bei 37 °C wurde der Überstand abgenommen, 10 min lang bei 100 °C gekocht und anschließend mit einem Luftstrom getrocknet. Der Rückstand wurde in SDS-Auftragspuffer aufgenommen und mit einem Tris-Tricin-Gel analysiert (s. II.2.4.4.2).

Trypsinmischung:	NH ₄ HCO ₃	100 mM
	Triton X-100	0,01 % (w/v)
	Trypsin	1/500 w der Probe

BNPS-Spaltung auf der Membran (verändert nach CRIMMINS et al. 1990)

Für die Spaltung mit 2-(2'-Nitrophenylsulphenyl)-3-methyl-3'-bromindolein (BNPS-Skatol, Fluka) mußten die im SDS-Gel (s. II.2.4.4.2) aufgetrennten Proteine zunächst auf eine Membran geblottet werden (vgl. II.2.4.5). Die gewünschten Banden wurden aus der Membran mit einem Skalpell ausgeschnitten und zerkleinert in ein Reaktionsgefäß mit 200 µl BNPS-Lösung (1,3 µg BNPS/µl Eisessig) gegeben. Die Reaktion fand 30 bis 60 min lang im Dunkeln bei 47 °C statt. Der Überstand wurde abgenommen, mit einem Volumen A. bidest versetzt und 5 min lang bei 13.000 g zentrifugiert. Der Überstand der Zentrifugation wurde mit einem Luftstrom

getrocknet, der Rückstand in 50 µl A. bidest aufgenommen, nochmals getrocknet und dann in SDS-Auftragspuffer 5 min lang bei 100 °C gekocht.

Die Membranstücke wurden 5 mal mit je 500 µl A. bidest gewaschen und in einem Luftstrom getrocknet. Die auf der Membran immobilisierten Peptide wurden mit 60 µl Elutionspuffer durch mehrfaches Mischen 60 min lang bei RT eluiert und danach 60 min lang bei RT mit 6 µl BNPS-Auftragspuffer inkubiert.

Elutionspuffer:	Tris/HCl pH 9,1	50 mM
	SDS	2 % (w/v)
	Triton X-100	1 % (w/v)
BNPS-Auftragspuffer:	DTT	100 mM
	Glycerin	60 % (w/v)
	BPB	0,3 % (w/v)

Die Spaltstücke aus dem Überstand und die von der Membran eluierten wurden entweder einzeln oder vereinigt auf ein Tris-Tricin-Gel (s. II.2.4.4.2) aufgetragen.

NTCB-Spaltung auf der Membran

Wie die Spaltung mit BNPS-Skatol wurde auch die Spaltung mit 2-Nitro-5-Thiocyanobenzoessäure (NTCB) auf der PVDF-Membran durchgeführt (s. o.). Zu der zerkleinerten Membran wurden 200 µl 50 mM Tris/HCl pH 8,0 einschließlich einer der 10-fachen Menge des eingesetzten Proteins entsprechenden Menge an NTCB gegeben. Die Proben wurden zunächst 30 min bei 37 °C inkubiert, dann wurde der pH-Wert durch Zugabe von 1 M NaOH auf 9,0 erhöht und die Reaktion 16 h bei 37 °C fortgesetzt. Der Überstand der Reaktion und die Membranstücke wurden genauso behandelt, wie die der BNPS-Skatol-Spaltung (s. o.).

II.2.5.1.3 Sequenzierung des N-Terminus

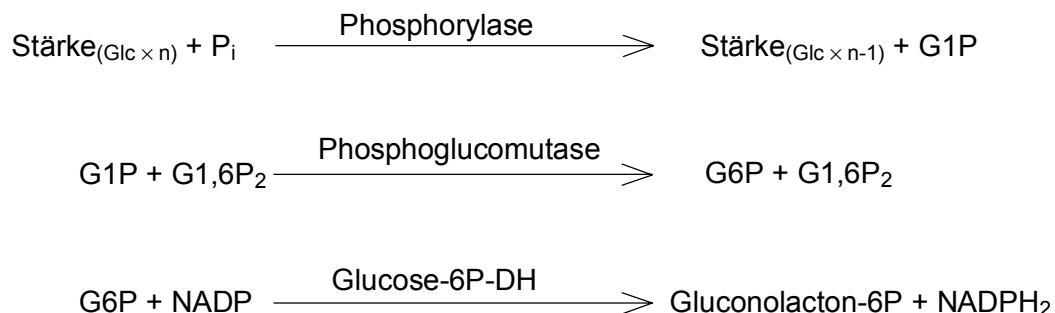
Die auf einer PVDF-Membran immobilisierten Proteine wurden von Dr. H. Faulhammer, Lehrstuhl Biochemie I, Universität Bayreuth, N-terminal nach EDMAN & BEGG (1967) ansequenziert. Die Methode wurde durchgeführt wie bei VORNLOCHER et al. (1997) beschrieben.

II.2.5.2 Bestimmung von Enzymaktivitäten

II.2.5.2.1 Bestimmung der abbauenden Aktivität der Phosphorylase

Stärkeabbauende Phosphorylaseaktivität wurde im gekoppelten optischen Test als Freisetzung von G1P aus Stärke in Anwesenheit von Orthophosphat bestimmt (STEUP 1990). Das bei diesem Verfahren freigesetzte G1P wird mit Glucose-1,6-bisphosphat (G1,6P₂) durch Phosphoglucomutase in G6P und dieses anschließend durch Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in Gluconolacton-6-Phosphat umgewandelt. Das entstehende NADPH₂ kann im Photometer bei 334 nm anhand einer Ex-

tinktionsänderung gemessen werden. Die entwickelte Menge an NADPH₂ ist dabei proportional der Menge an freigesetztem G1P.



Das Reaktionsgemisch und bis zu 100 µl Extrakt wurden in einem Gesamtvolumen von 1 ml in einer Halbmikroküvette 5 min lang in einem Photometer (Eppendorf 1101M) bei 30 °C vorinkubiert. Die Extinktion bei 334 nm wurde mit Hilfe eines Schreibers registriert. Der Start der Reaktion erfolgte nach Registrierung der Hintergrundaktivität durch die Zugabe von 0,1 % löslicher Stärke (nach Zulkowsky, Serva). Die Extinktionsänderung wurde mindestens 15 min lang bei 334 nm und 30 °C verfolgt.

Reaktionsgemisch:	Imidazol/HCl pH 7,0	50 mM
	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ pH 7,0	27,5 mM
	EDTA	1 mM
	MgCl ₂	5 mM
	Na ₂ MoO ₄	5 mM
	Glucose-1,6-bis-Phosphat	4 µM
	NADP	0,6 mM
	Phosphoglucomutase	2 U
	Glucose-6-P-Dehydrogenase	5 U

Um zu überprüfen, ob anstelle von Stärkephosphorylase Maltosephosphorylase Aktivität in den jeweiligen Präparaten zeigt, wurde die Reaktion anstatt mit Stärke mit 10 mM Maltose gestartet.

Die Berechnung der Phosphorylaseaktivität in Einheiten (mU) von Nanomolen freigesetztem G1P min⁻¹ erfolgte nach der Formel:

$$U \left[\text{mmol Glc} - 1 - P \cdot \text{min}^{-1} \right] = \frac{E}{\text{min} \cdot \frac{1}{\epsilon \cdot d}} \cdot \frac{V_{\text{Küvette}}}{V_{\text{Extrakt}}}$$

wobei: E = Netto-Extinktionsänderung in Gegenwart von löslicher Stärke
 ε = millimolarer Extinktionskoeffizient von NADPH₂ bei 334 nm (6,18/cm)
 d = Küvettendicke (1 cm)

Bestimmung des pH-Optimums der phosphorolytischen Aktivität

In Abwandlung der Standardaktivitätsbestimmung konnte die Messung der Aktivität bei unterschiedlichen pH-Werten nicht kontinuierlich erfolgen. Die in dem gekoppelten Test enthaltenen Hilfsenzyme haben eigene pH-Optima, die das Ergebnis verfälschen würden. Deshalb erfolgte zunächst der Stärkeabbau durch die Phosphorylase bei verschiedenen pH-Werten. Die entstandene G1P-Menge wurde dann bei konstantem pH 7,0 quantifiziert. Die verwendeten Puffersysteme zeigt **Tabelle 8**.

Tabelle 8: Puffersysteme zur Bestimmung des pH-Optimums

Puffer	pH
Natriumacetat	4,0-6,0
Imidazol	6,0-8,0
BTP ²⁰	8,0-9,0

Im Gegensatz zu dem sonst verwendeten 50 mM Imidazolpuffer wurden diese Puffer mit der erhöhten Konzentration von 100 mM eingesetzt. Als Phosphatdonor diente im Bereich zwischen pH 5,5 und 8,0 Na-Phosphatpuffer (25 mM, hergestellt aus NaH_2PO_4 und Na_2HPO_4 gleicher Molarität) mit dem korrespondierenden pH-Wert. Da sich Phosphatpuffer nicht auf pH-Werte über oder unter diesen Werten einstellen lässt, musste für die Ansätze unter pH 5,5 25 mM des sauren NaH_2PO_4 und oberhalb von pH 8,0 25 mM des basischen Na_2HPO_4 als Phosphatdonor eingesetzt werden. Die Wirkung dieser Lösungen auf den Gesamt-pH-Wert wurde überprüft. Aufgrund der hohen Pufferkapazität der oben angegebenen Puffersysteme veränderten die Phosphatlösungen den pH-Wert der gesamten Lösung nicht.

Für jeden pH-Wert wurden 3 Inkubationsansätze eingesetzt. Ein Aliquot des zu messenden Extraktes wurde mit dem jeweiligen Puffer, Phosphatdonor und A. bidest versetzt, die Reaktion durch Zugabe von Stärke gestartet. Nach 10, 15 und 20 min im 30 °C-Wasserbad wurde ein Ansatz entnommen, bei 100 °C 2 Minuten lang gekocht, 10 min lang in der Eppendorf-Tischzentrifuge bei 13.000 g zentrifugiert und nach Abkühlung die G1P-Menge im Überstand gemessen. Als Kontrolle diente ein sofort nach Zugabe der Stärke gekochter Inkubationsansatz (0 Minuten). Die Messung erfolgte wie oben beschrieben nach Zugabe der Hilfsstoffe und -enzyme bei pH 7,0.

Substratabhängigkeit und Substratspezifität

Die Abhängigkeit der stärkeabbauenden Phosphorylaseaktivität von den Substraten Stärke und Phosphat sowie ihre Substratspezifität konnte im kontinuierlichen Enzymtest gemessen werden. Für die Bestimmung der Substratabhängigkeit wurde die Umsatzrate der verschiedenen Phosphorylaseformen bei unterschiedlichen Sub-

²⁰ BTP = Bis-Tris-Propan (Sigma)

stratkonzentrationen festgestellt. Von den verschiedenen Oligo- und Polyglucanen wurden Konzentrationen zwischen 0 mg/ml und 30 mg/ml eingesetzt. Für die Bestimmung der Abhängigkeit von Phosphat wurden Konzentrationen zwischen 0 mM und 100 mM Phosphat verwendet. Aus den erhaltenen Werten konnte die Michaelis-Konstante (K_M -Wert) für das jeweilige Substrat bestimmt werden. K_M wurde anhand des Michaelis-Menten-Diagramms nach KOOLMAN & RÖHM (1994) errechnet.

II.2.5.2.2 Messung der synthetisierenden Aktivität der Phosphorylase

Die stärkeaufbauende Aktivität der Phosphorylasen wurde über die Freisetzung von Phosphat aus dem Substrat G1P bestimmt. Freigesetztes Phosphat wurde in dieser Methode über seine Komplexbildung mit Molybdat nachgewiesen. Im nichtreduzierten Zustand hat dieser Komplex eine leicht gelbliche Färbung, die sich zwischen 320 und 440 nm messen lässt.

Es handelte sich um eine diskontinuierliche Messung nach CHANG und SU (1986). Der Inkubationsansatz wurde in leicht veränderter Form verwendet. Zu den Zeitpunkten 0 (Blindwert), 5, 10, und 15 min wurden zwei Proben zu je 50 μ l zur Phosphatbestimmung entnommen. Inkubiert wurde im Wasserbad bei 37 °C. Die aliquoten Mengen wurden zu je 400 μ l Färbereagens gegeben, das aus 10 mM Ammoniummolybdat, Aceton und 5 N Schwefelsäure im Verhältnis 1:2:1 bestand (HEINONEN & LAHTI 1981). Nach kurzem Mischen wurde ausgefallenes Protein 15 sec lang bei 13.000 g in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert. Dem Überstand wurde nach Überführung in eine Halbmikroküvette 40 μ l 1 M Citronensäure zugegeben. Die Säure komplexiert überschüssiges Molybdat und verringert so eine ansonsten starke zeitliche Veränderung der Extinktion. Die Messung des entstandenen Farbstoffs erfolgte im Beckman-Photometer (Typ UV-DU 50) bei 380 nm. Aus den Messpunkten zu verschiedenen Zeitpunkten wurde eine Gerade gebildet, deren Steigung die Enzymaktivität ergab. Die Umrechnung in nmol Phosphat min^{-1} erfolgte mittels einer Eichkurve, die zwischen 30 und 4000 μ M eine Gerade ergab. Als Kontrollen dienten gleich behandelte Ansätze ohne Enzympräparat bzw. ohne Stärke.

Inkubationsansatz:	MES ²¹ /NaOH pH 6,0	40 mM
	Glucose-1-Phosphat	10 mM
	lösliche Stärke ²²	0,5 % (w/v)

Bestimmung des pH-Optimums der Stärkesynthese

Auch von der stärke-synthetisierenden Aktivität der Phosphorylasen wurde ein pH-Optimum bestimmt. In **Tabelle 9** sind die verwendeten Puffersysteme aufgeführt.

²¹ 2-[N-Morpholino]-ethansulfonsäure

²² nach Zulkowsky (Serva)

Die verschiedenen Puffer ersetzen im Inkubationsansatz den MES-Puffer mit pH 6,0. Ansonsten wurde der Test durchgeführt wie oben beschrieben.

Tabelle 9: Puffersysteme zur Bestimmung des pH-Optimums

Puffer	pH
Natriumacetat	4,0-6,0
MES ²¹	6,0-7,0
BTP ²⁰	7,0-9,0

Bestimmung der Abhängigkeit der Synthesereaktion von der Substratkonzentration

Um festzustellen, inwiefern die stärke-synthetisierende Aktivität der Phosphorylase von Oligo- und Polyglucanen als Primer der Synthese beeinflusst wird, wurde die Phosphat-Bildung bei Konzentrationen von 0 mg/ml bis 30 mg/ml gemessen. Die Abhängigkeit von dem Substrat G1P wurde zwischen 0 mM und 100 mM G1P ermittelt. Das in dem jeweiligen Inkubationsansatz anfallende Phosphat wurde wie oben beschrieben quantifiziert.

II.2.5.3 Bestimmung von Kohlenhydraten

Aufschluß der Zellen

10, 20 und 30 mg der zu analysierenden Proben wurden in 2 ml-Reaktionsgefäße eingewogen und 500 µl Extraktionspuffer (80 % Ethanol, 20 % 5 mM HEPES pH 7,5) zugefügt. Nach 75 min bei 70 °C und gelegentlichem Mischen wurden die Proben 5 min lang bei 13.000 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Im Überstand konnten die löslichen Zucker bestimmt werden (s. u.). Das Pellet wurde einmal mit 750 µl 80 % Ethanol und zweimal mit 1 ml A. bidest gewaschen, dazwischen jeweils 5 min lang zentrifugiert. Der Überstand des letzten Waschschritts wurde als Kontrolle aufgehoben und die löslichen Zucker bestimmt. Das Pellet wurde gewogen, dann mit 1 ml A. bidest überschichtet, in einen Metallständer eingespannt und 4 h lang bei 100 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden die Proben 5 min bei 13.000 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und im Überstand und im Pellet die Stärke bestimmt (s. u.).

Bestimmung der löslichen Zucker

10 bis 100 µl des Überstandes nach Behandlung bei 70 °C und der Waschkontrolle (s. o.) wurden mit A. bidest auf 700 µl aufgefüllt und zu der Reaktionsmischung gegeben.

Reaktionsmischung:	Tricin/NaOH pH 7,6	200 mM
	MgSO ₄	3 mM
	ATP	1,1 mM
	NADP	0,3 mM

Nachdem die Extinktion dieses Gemischs mit einem Endvolumen von 1 ml bei 334 nm bestimmt worden war, wurden 5 µl eines Hexokinase/Glucose 6-Phosphat-Dehydrogenase-Gemisches zugegeben und die Extinktionsänderung bis zum Erreichen eines Plateaus verfolgt. Der Zuckergehalt in der Küvette wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zuckergehalt [mg]} = \left(\frac{\Delta E}{\epsilon \times d} \times \frac{V_{\text{Küv}}}{V_{\text{Extrakt}}} \times M \right) / g \text{ Frischgewicht}$$

ΔE =Extinktionsänderung

ϵ =Extinktionskoeffizient (hier von NADP (millimolar)=6,18/cm²)

d =Dicke der Küvette (hier 1 cm)

M =Molmasse von Glucose

Bestimmung der Stärke

Zu dem Pellet nach Inkubation bei 100 °C (s. o.) und zu 200 µl des Überstandes wurden 500 µl 100 mM Natriumacetatpuffer pH 4,8, 2 U Amyloglucosidase und 3,2 U α -Amylase zugegeben. Nach 2-stündiger Inkubation bei 37 °C und gelegentlichem Mischen wurde der Zuckergehalt des Überstandes wie oben beschrieben bestimmt.

II.2.6 Immunologische Methoden

II.2.6.1 Antikörperherstellung

Es wurden 2 Versuche zur Herstellung von Antikörpern in Kaninchen unternommen. Zum einen wurden ca. 1 mg Phosphorylase-Protein aus einem SDS-Gel (s. II.2.4.4.2) ausgeschnitten und getrocknet zur Firma BioScience (Göttingen) geschickt. Dort wurde das Gel zerkleinert und auf 4 Injektionen verteilt dem Kaninchen verabreicht. Da dies keinen Erfolg zeigte, wurde beim zweiten Versuch das Eluat der Cycloheptaamylosesäule (vgl. II.2.4.2.1) konzentriert und dem Kaninchen die beiden enthaltenen Proteine, wiederum auf 4 Portionen verteilt, in Lösung injiziert. Nach 4 und 8 Wochen wurde der Titer der Antikörper in Proben der 1. und 2. Blutung analysiert. Nach 10 Wochen wurde die Entblutung des Kaninchens vorgenommen. Die erhaltenen Blutentnahmen wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

II.2.6.2 Immunnachweis der Phosphorylase nach Westernblotting

Zur Überprüfung der Spezifität von Antikörperpräparaten und zur Detektion von Phosphorylase in elektrophoretisch aufgetrennten (s. II.2.4.4) und auf eine PVDF-Membran transferierten (vgl. II.2.4.5) Extrakten wurde Immunprinting durchgeführt. Dafür wurde die Membran in Blockierlösung (TBS mit 2 % Magermilchpulver²³ und 0,05 % Tween[®] 20²⁴) bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das jeweilige Antikörperpräparat in einer Verdünnung von 1:250

²³ Naturaflor (Töpfer GmbH)

²⁴ Tween[®] 20: Polyoxyethylensorbitan Monolaureat (Sigma)

bis 1:1000 zugegeben und weitere 90 min lang bei RT geschüttelt. Nicht-gebundene Antikörper wurde dann durch dreimaliges Waschen mit Blockierlösung entfernt und die Membran 90 min lang mit dem sekundären Antikörper (1:1000-Verdünnung) in Blockierlösung inkubiert. Bei dem sekundären Antikörper handelte es sich um einen mit der Alkalischen Phosphatase konjugierten, gegen Immunglobulin G aus Kaninchen gerichteten Antikörper aus Ziege²⁵ (Bio-Rad). Nicht-gebundene Antikörper wurde wiederum durch dreimaliges Waschen mit Blockierlösung, gefolgt von einmaligem Waschen in TBS, entfernt. Zur Färbung der mit dem Antikörper komplexierten Proteinbanden wurde die Membran in Alkalischen Phosphatase-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 9,5, 0,5 mM MgCl₂) überführt und 250 µl BCIP²⁶-Stammlösung und 250 µl NBT²⁷-Stammlösung zugefügt. Die Färbung erfolgte je nach Stärke der Reaktion 10 bis 30 min lang und wurde durch Inkubation in A. bidest/HCl gestoppt. Die Membran wurde mit A. bidest gewaschen, an der Luft getrocknet und bei RT im Dunkeln gelagert.

BCIP ²⁶ -Stammlösung:	1,5 % (w/v) BCIP in N,N'-Dimethylformamid (DMF)
NBT ²⁷ -Stammlösung:	3,0 % (w/v) NBT in 70 % DMF

II.2.6.3 Kolonieblot

Zur Detektion von Bakterienklonen, die besonders viel Protein heterolog exprimieren (s. II.2.2.4) wurde ein Antikörper gegen den 6xHis-Tag der exprimierten Phosphorylase eingesetzt. Zunächst wurden *E. coli* M15 und *E. coli* BL21-CodonPlus™(DE3)-RIL mit dem Phosphorylasegen im Vektor pQE-30 transformiert (s. II.2.3.2), auf LB-Platten mit dem jeweiligen benötigten Antibiotikum ausgestrichen und üN bei 37 °C inkubiert. Nummerierte Nitrocellulosemembranen (Hybond™-C extra, Amersham) wurden 2 min lang auf die Platten gelegt, asymmetrisch mit einer Kanüle markiert und abgezogen. Sie wurden mit dem Rücken auf Platten mit dem gleichen Antibiotikum und zusätzlich 250 µM IPTG zur Induktion gelegt und 4 h lang bei 37 °C inkubiert. Die Originalplatten wurden 4 h bei 30 °C inkubiert. Dann wurden die Membranen 10 min lang auf einem in 10 % SDS getränkten Whatman 3MM CHR-Papier inkubiert, gefolgt von 5 min Denaturierungslösung, zweimal 5 min Neutralisierungslösung und 15 min 2xSSC, jeweils auf einem Whatman 3MM CHR-Papier.

Denaturierungslösung:	NaOH	0,5 M
	NaCl	1,5 M
Neutralisierungslösung:	Tris/HCl pH 7,4	0,5 M
	NaCl	1,5 M
Blockierpuffer:	3 % BSA in TBS	

²⁵ EIA Grade Affinity Purified Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Alkaline Phosphatase Conjugate, Bestellnr. 172-1016 (Bio-Rad)

²⁶ BCIP: 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat-p-toluidinsalz (Roth)

²⁷ NBT: p-Nitrobluetetrazolium (Roth)

TBS-Tween/Triton:	TBS	
	Triton X-100	0,2 % (w/v)
	Tween [®] 20	0,05 % (w/v)
AP-Puffer:	Tris/HCl pH 9,5	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl ₂	5 mM

Nach zwei 10minütigen Waschschritten in TBS wurden die Membranen 60 min in Blockierpuffer inkubiert, danach zweimal 10 min lang mit TBS-Tween/Triton und noch einmal 10 min lang mit TBS gewaschen. Die Inkubation mit dem 1:1000 in TBS/3% BSA verdünnten primären Antikörper Penta•His Antibody (Qiagen) fand 60 min lang bei RT statt. Nach weiteren zweimal 10 min Waschen in TBS-Tween/Triton und einmal 10 min in TBS wurde der sekundäre Antikörper 60 min lang in der Verdünnung 1:25.000 in TBS/3% BSA zugegeben. Bei dem sekundären Antikörper handelte es sich um ein Konjugat aus dem gegen Immunglobulin G aus Maus gerichteten Antikörper aus Kaninchen und der Alkalischen Phosphatase (Pierce, Bestellnr. 31332). Gefärbt wurden die Membranen nach dreimaligem Waschen mit TBS-Tween/Triton, wie in II.2.6.2 beschrieben, mit einem leicht abgewandelten Alkalische Phosphorylase-(AP)-Puffer. Die Signale wurden mit der Originalplatte verglichen und Einzelkolonien, denen starke Signale zugeordnet werden konnten, weiterverarbeitet.

III ERGEBNISSE

In dieser Arbeit wurden α -1,4-Glucan-Phosphorylasen aus Weizenblättern (*Triticum aestivum*, L. var. Star) gereinigt (III.1). Die Substratpräferenz und einige physikochemische Eigenschaften der isolierten cytosolischen Phosphorylase wurden untersucht (III.2) und die teilweise gereinigte cytosolische Phosphorylase diente zur Herstellung polyklonaler Antikörper in Kaninchen (III.3). Weiterhin konnten cDNAs der cytosolischen und plastidischen Phosphorylase aus Blättern und Körnern isoliert werden (III.4). Eine Expressions- und Aktivitätsanalyse der Phosphorylase-mRNA bzw. der Phosphorylaseproteine in verschiedenen Entwicklungsphasen wurde durchgeführt (III.5).

III.1 REINIGUNG DER PHOSPHORYLASEPROTEINE AUS WEIZENBLÄTTERN

7-8 Tage alte Weizenblätter wurden extrahiert wie unter II.2.4.1.1 beschrieben und die Proteine durch PEG-Fällung konzentriert. Dieser konzentrierte Rohextrakt stellte bei jedem Reinigungsversuch das Ausgangsmaterial dar.

III.1.1 Reinigung der cytosolischen Phosphorylasen

Vorarbeiten zeigten, dass die cytosolische Phosphorylasen der Weizenblätter durch Cycloheptaamylose inhibiert werden (SCHUPP 1997). Dieser Inhibitor wurde nach der Methode von VRETBLAD (1974) an Sepharose 6B kovalent gekoppelt (s. II.2.4.2.1) und als Affinitätsmatrix getestet.

III.1.1.1 Isolierung von zwei Proteinen durch Affinitätschromatographie an Cycloheptaamylose-Sepharose

Abbildung 2 zeigt die Phosphorylaseaktivitäten von Proben einiger Schritte der Affinitätsreinigung. Der Rohextrakt von Weizenblättern enthält drei Phosphorylaseformen: P1, P2 und P3 (Bahn 1). Durch Zugabe von 5 % PEG werden einige Proteine aus dem Rohextrakt entfernt. Dieser Fällungsschritt hat keine Auswirkung auf die Phosphorylaseproteine (SCHUPP 1997). Nach fünffacher Konzentrierung der im Überstand der ersten Fällung enthaltenen Proteine durch Erhöhung der PEG-Konzentration auf 30 % und Dialyse gegen den Laufpuffer der Chromatographie sind noch ca. 84 % der Phosphorylaseaktivität in dem Konzentrat des Rohextraktes enthalten (vgl. Tabelle 11, S. 57). Auf dem Aktivitätsgel sind in diesem konzentrierten Rohextrakt weiterhin alle drei Phosphorylaseformen zu erkennen (Abbildung 2, Bahn 2). Wird das Konzentrat über die Affinitätssäule aus Cycloheptaamylose-Sepharose gegeben, so lässt sich im Filtrat nur noch die Aktivität der Phosphorylaseform P3 nach-

weisen (Bahn 3). Nach Einsetzen des gelösten Inhibitors im Chromatographiepuffer als Elutionsmittel waren im Eluat die Aktivitäten der cytosolischen Phosphorylasen P1 und P2 zu finden (Bahn 4). Zur Bestimmung der Aktivität der Elutionsfraktionen wurde zunächst die Cycloheptaamylose durch Entsalzung aus den Proben entfernt (s. II.2.4.3).

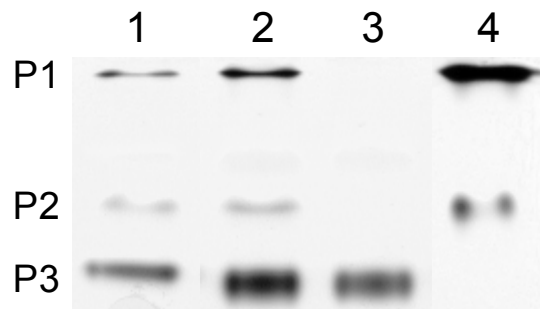


Abbildung 2: Zymogramm der stärkesynthetisierenden Phosphorylaseaktivität ausgewählter Proben der Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie an Cycloheptaamylose-Sepharose.

Auftrennung der Proben erfolgte durch PAGE in einem 7,5 %igen nicht-denaturierenden Gel mit 0,1 % einpolymerisiertem Glycogen. Durch Phosphorylaseaktivität während der Inkubation des Gels mit G1P gebildete Stärke wurde mit Jod blau angefärbt (II.2.4.4.1).

Bahn 1 enthält Rohextrakt aus Weizenblättern, Bahn 2 den mit 30 % PEG gefällten und gegen den Chromatographiepuffer dialysierten Rohextrakt (II.2.4.1.1). In Bahn 3 wurde das Filtrat der Cycloheptaamylose-Sepharosesäule aufgetragen und in Bahn 4 das Eluat der Säule (II.2.4.2.1). Bezeichnung der Phosphorylasen: **P1** = cytosolische Phosphorylase 1, **P2** = cytosolische Phosphorylase 2, **P3** = plastidische Phosphorylase.

Abbildung 3 zeigt exemplarisch das Profil des Proteingehaltes und der Phosphorylaseaktivität in Elutionsfraktionen einer Cycloheptaamylose-Affinitätschromatographie eines konzentrierten Weizenblattrohextraktes. Zu Beginn der Elution zeigen beide Kurven, der Proteingehalt und die Phosphorylaseaktivität, eine sehr ähnliche Steigung. Die Aktivität steigt ca. fünf Fraktionen vor dem Proteingehalt massiv an. Beide Werte erreichen ihr Maximum bei Fraktion 40. Danach fällt die Kurve der Phosphorylaseaktivität rapide ab und erreicht bei Fraktion 50 fast den Nullpunkt, während der Proteingehalt nur langsam zurückgeht. Dies deutet darauf hin, dass in den späteren Fraktionen Protein von der Säule eluiert, welches keine Phosphorylaseaktivität zeigt.

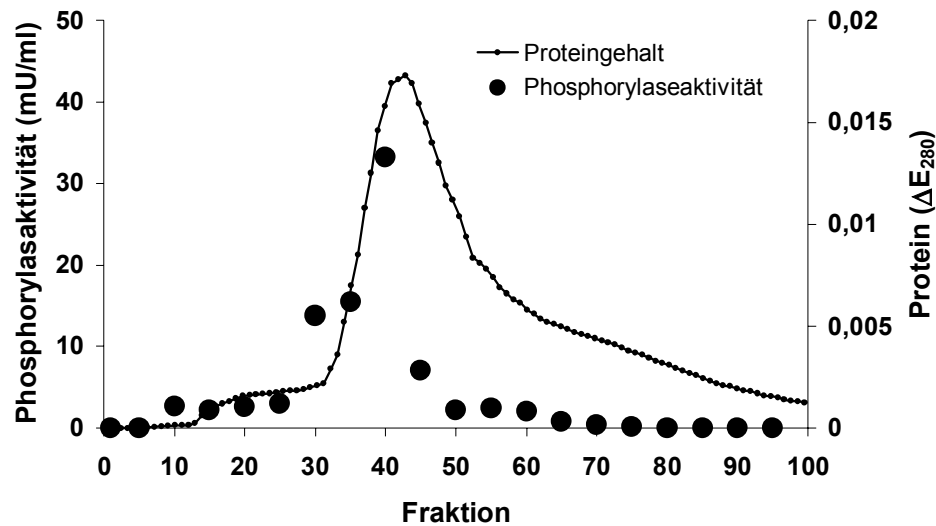


Abbildung 3: Proteingehalt (—) und Phosphorylasaktivität (●) in Elutionsfraktionen einer Affinitätschromatographie eines konzentrierten Weizenblattrohextraktes an Cycloheptaamylose-Sepharose (II.2.4.2.1).

Der Proteingehalt wurde anhand der Extinktion des Proteins bei 280 nm verfolgt, die Phosphorylasaktivität wurde in der abbauenden Richtung mit dem gekoppelten optischen Test gemessen, nachdem die Cycloheptaamylose durch Entsalzung entfernt worden war (II.2.5.2.1 und II.2.4.3).

Abbildung 4 zeigt Phosphorylas- (A) und Proteinformen (B) der Fraktionen der Affinitätschromatographie aus Abbildung 3. In allen Fraktionen ist Aktivität der Phosphorylasform P1 zu sehen. Bis Fraktion 65 ist diese Aktivität stark, danach nur noch schwach vertreten. Von Fraktion 30 bis 45 ist in den Fraktionen zusätzlich Aktivität der Form P2 nachzuweisen, die ihr Maximum, entsprechend dem gemessenen Maximum der Phosphorylasaktivität in Fraktion 40 hat (Abbildung 3).

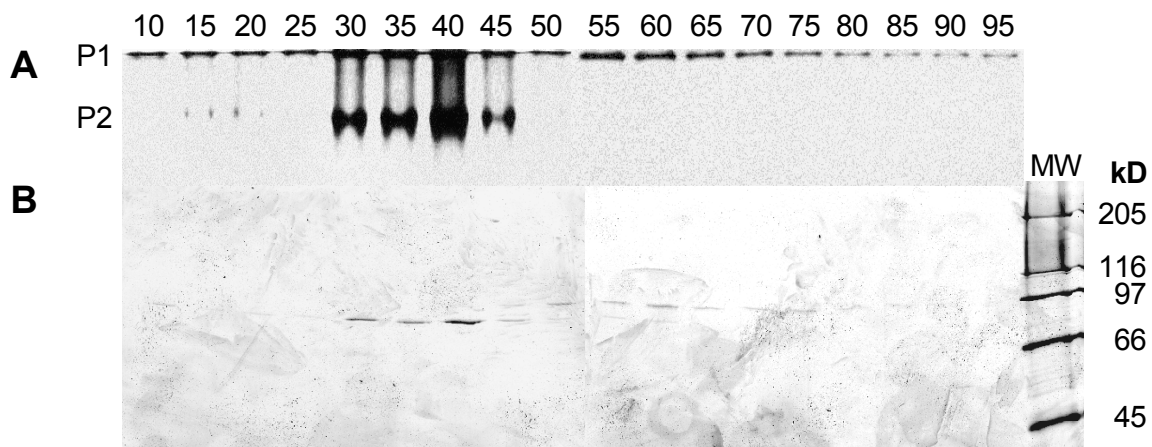


Abbildung 4: Phosphorylasaktivität (A) und Proteinanalyse (B) ausgewählter Fraktionen der in Abbildung 3 dargestellten Affinitätschromatographie eines konzentrierten Weizenblattrohextraktes an Cycloheptaamylose-Sepharose.

In A wurden die Fraktionen 10-95 aufgetrennt und ihre stärke-synthetisierenden Aktivitäten wie in Abbildung 2 beschrieben nachgewiesen. P1 und P2 ebenfalls wie in Abbildung 2. B zeigt ein 7,5 %iges SDS-Gel der Fraktionen 10-95, gefärbt mit Silbernitrat (s. II.2.4.4.2). MW = Molekulargewichtsmarker SDS 6H (Sigma).

Der Proteinnachweis im SDS-Gel zeigt in den Fraktionen 10 bis 60 eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht um 90 kD (Abbildung 4 B). Ab Fraktion 45 wird sie von einer Bande mit einem Molekulargewicht um 100 kD begleitet. Dieses Protein eluierte weiter von der Säule bis einschließlich Fraktion 85. In Übereinstimmung mit dem Verlauf des Proteingehaltes in Abbildung 3 zeigt das SDS-Gel ebenfalls in Fraktion 40 die intensivste Proteinfärbung. In den Elutionsfraktionen der Cycloheptaamylose-Sepharosesäule sind neben diesen zwei Proteinen, die im folgenden zur Vereinfachung als 90 kD- und 100 kD-Protein bezeichnet werden, keine weiteren Proteinbanden nachzuweisen. Die weite Spreizung der beiden in den Elutionsfraktionen enthaltenen Proteine wurde erst beobachtet, nachdem eine Affinitätssäule mit einem großen Volumen von 45 ml in Betrieb genommen worden war. Von Cycloheptaamylose-Sepharosesäulen kleineren Volumens (15 ml) eluierte das 90 kD-Protein alleine nur über zwei bis vier, nicht über vierzig Fraktionen.

Vergleicht man die Proteinausstattung der einzelnen Fraktionen mit deren Aktivitätsformen, so fällt auf, dass die Phosphorylaseaktivität P1 scheinbar von dem 90 kD-Protein und dem 100 kD-Protein gebildet wird. Denn in den Fraktionen 10 bis 40 ist nur das 90 kD-Protein enthalten, welches für die Aktivität P1 verantwortlich sein kann, und die Fraktionen 65 bis 95 enthalten nur das 100 kD-Protein, zeigen aber ebenfalls P1-Aktivität. Das 90 kD-Protein bildet aber auch die Phosphorylaseaktivität P2 in den Fraktionen 30 bis 40. Dieses Protein ist demnach mit Sicherheit eine cytosolische Phosphorylase. Dies ist bei dem 100 kD-Protein nicht sicher, da in den Fraktionen, in denen es alleine enthalten ist, nur so wenig P1-Aktivität vorhanden ist, dass diese auch von einer sehr geringen, in einem silbergefärbten SDS-Gel nicht nachweisbaren Menge 90 kD-Protein gebildet worden sein könnte. Es stellt sich die Frage, ob das 100 kD-Protein eine Phosphorylase ist, deren Aktivität durch die Affinitätsreinigung stark abgeschwächt wurde, oder ob es sich um ein Protein mit einer völlig anderen Funktion handelt. Eine Trennung der beiden Proteine war nötig um dieses Problem zu klären.

III.1.1.2 Trennung des 90 kD- und des 100 kD-Proteins

Während der Versuche, die zwei durch die Cycloheptaamylose-Sepharosesäule isolierten Proteine zu trennen, zeigte sich, dass sie eine sehr ähnliche Nettoladung besitzen. Eine Trennung über eine Anionenaustauschersäule (Q-Sepharose) war nicht möglich, beide Proteine eluierten bei der gleichen Salzkonzentration. Auch eine Trennung durch Chromatofokussierung gelang nicht. In Abbildung 5 A ist zu sehen, dass sowohl das 90 kD- als auch das 100 kD- Protein aus drei pI-Formen besteht, die sich in ihren isoelektrischen Punkten sehr ähnlich sind. Die pI-Werte dieser Formen liegen zwischen 5,95 und 5,75. Inkubiert man das Gel so, dass die enthaltenen potenziellen Phosphorylasen Stärke synthetisieren können (Abbildung 5 B), zeigt

sich, dass nur die pI-Formen des 90 kD-Proteins Aktivität aufweisen. Die pI-Formen des 100 kD-Proteins bilden hingegen keine Stärke. Dies ist ein Hinweis darauf, dass es Unterschiede zwischen den pI-Formen des 100 kD-Proteins und denen des 90 kD-Proteins geben muss, auch wenn sie in ihrer Ladung schwer zu unterscheiden sind. Weiterhin bestärkt dieses Ergebnis den Zweifel daran, dass das 100 kD-Protein eine Phosphorylase ist, da es keine Aktivität wie das 90 kD-Protein zeigt.

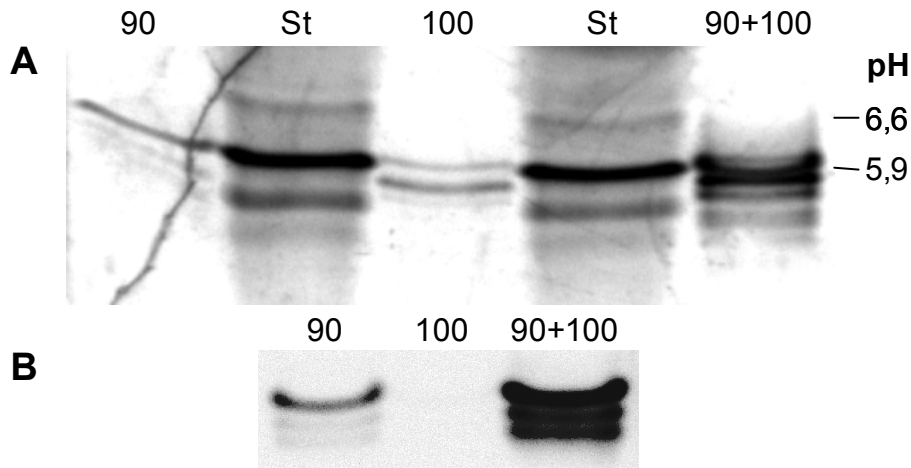


Abbildung 5: pI-Muster des 90 kD- und des 100 kD-Proteins nach isoelektrischer Fokussierung.

Gewonnen wurden die Proteine durch Vereinigung und Konzentrierung derjenigen Elutionsfraktionen der Cycloheptaamylose-Sepharosesäule, die entweder nur das 90 kD- oder nur das 100 kD-Protein enthielten. **90** bezeichnet das 90 kD-Protein, **100** das 100 kD-Protein. In der Bahn **90+100** wurden beide Proteine gemeinsam, allerdings in höherer Konzentration, auf das Gel aufgetragen. **St** bezeichnet den pI-Standard von Sigma. In **A** wurden die Proteine in dem IEF-Gel mit Silbernitrat angefärbt (s. II.2.4.4.3 und II.2.4.4.2). **B** zeigt ein mit G1P und 0,1 % Stärke inkubiertes IEF-Gel der gleichen Proben (II.2.4.4.1). Durch Phosphorylasen gebildete Stärke wurde mit Jod blau angefärbt.

Die Trennung der beiden Proteine gelang über eine der Cycloheptaamylose-Sepharosesäule aus III.1.1.1 nachgeschaltete zweite Cycloheptaamylosesäule. Abbildung 4 zeigt, dass das 90 kD-Protein als erstes von der Affinitätssäule eluiert. Es scheint zur Ablösung von der Säule eine geringere Cycloheptaamylose-Konzentration zu benötigen. Daher wurde das gesamte Eluat, der wie unter II.2.4.2.1 beschrieben durchgeführten Affinitätsreinigung an Cycloheptaamylose-Sepharose, auf eine zweite Cycloheptaamylose-Sepharosesäule aufgetragen (s. II.2.4.2.2) und das gebundene Protein mit einem linearen β -Cycloheptaamylosegradienten eluiert. In Abbildung 6 ist zu sehen, dass sich schon ein beträchtlicher Teil des aufgetragenen Proteins im Filtrat befindet. An die Säule gebundenes Protein beginnt bereits bei geringen Cycloheptaamylose-Konzentrationen zu eluieren.

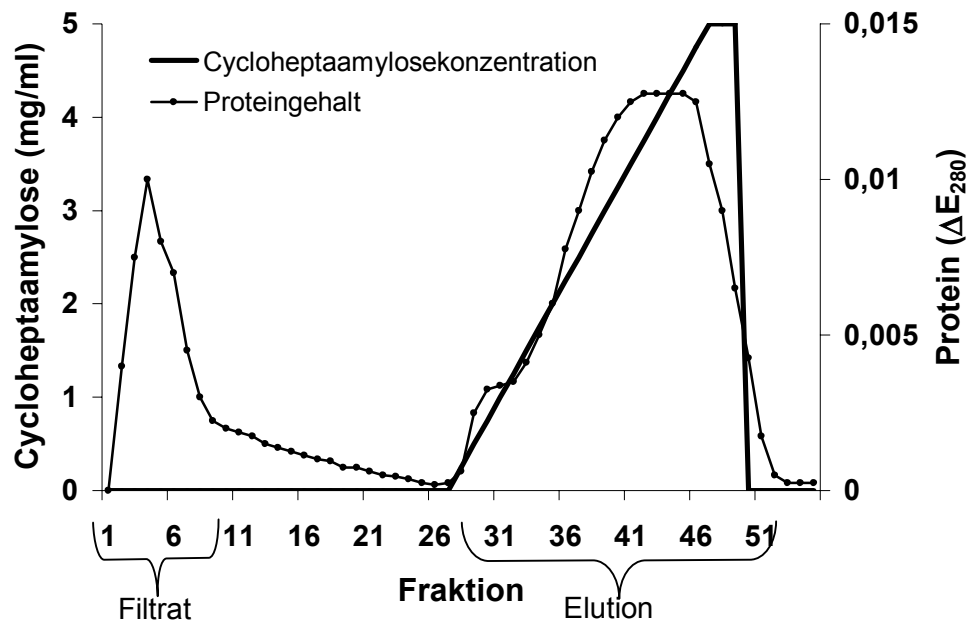


Abbildung 6: Proteingehalt in Filtrat- und Elutionsfraktionen einer Rechromatographie des gesamten Eluates aus Abbildung 4 an Cycloheptaamylose-Sephrose.

Die dünne Linie zeigt den Proteingehalt des Filtrates und des Eluates, die dicke Linie gibt den Verlauf des Cycloheptaamylosegradienten wieder. Der Proteingehalt wurde anhand der Extinktion des Proteins bei 280 nm verfolgt.

Eine Analyse des Filtrates und der Elutionsfraktionen hinsichtlich ihrer Phosphorylaseaktivität zeigt, dass sich die gesamte Aktivität im Filtrat und in den ersten Eluatfraktionen wiederfindet (Abbildung 7 A). In diesen Fraktionen ist nur eine Proteinbande zu erkennen, das 90 kD-Protein (Abbildung 7 B). Dieses Protein bindet nicht vollständig an die Säule, ein Großteil befindet sich im Filtrat. Der gebundene Teil eluiert bereits bei geringen Cycloheptaamylosekonzentrationen von unter 1 mg/ml (Fraktion 28-32). Ab Fraktion 36 kann keine Aktivität mehr nachgewiesen werden. Ab Fraktion 34, dies entspricht einer ungefähren Cycloheptaamylosekonzentration von 1,5 mg/ml, eluiert das 100 kD-Protein. Die erste Fraktion (F34), die dieses Protein enthält, zeigt auf dem Aktivitätsgel noch eine kleine Spur der P1-Aktivität. Dies ist aber höchstwahrscheinlich das Produkt einer auf dem Silbergel kaum nachweisbaren Menge 90 kD-Protein. Das 100 kD-Protein eluiert bis einschließlich Fraktion 44. Obwohl die Absorption bei 280 nm in Abbildung 6 weiterhin hoch bleibt, kann kein Protein mehr im Gel nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine Beeinflussung der Extinktion durch das Elutionsmittel Cycloheptaamylose hin.

Nach der gelungenen Trennung der beiden im Eluat der ersten Cycloheptaamylose-Säule enthaltenen Proteine zeigt nur das 90 kD-Protein Phosphorylaseaktivität. Da dieses Protein aber nicht vollständig an die Säule bindet, ist diese Rechromatographie an Cycloheptaamylose-Sephrose mit einem hohen Verlust an Aktivität des 90 kD-Proteins verbunden. Die vereinigten Elutionsfraktionen mit 90 kD-Protein dieser Säule zeigten nur noch 3 % der Aktivität des Ausgangsrohextraktes (vgl. Tabelle 11, S.57).

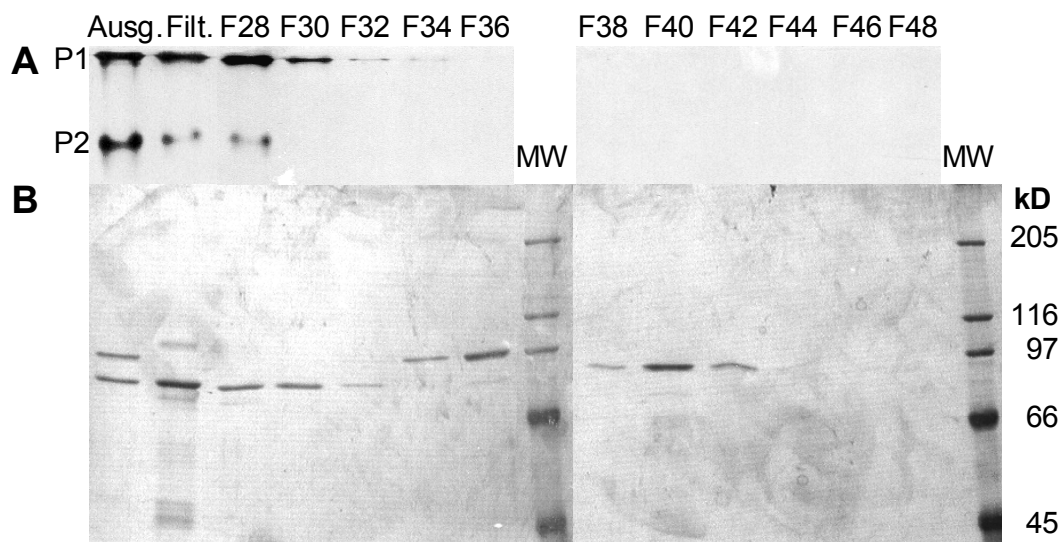


Abbildung 7: Phosphorylaseaktivität (A) und Proteinausstattung (B) ausgewählter Fraktionen der in Abbildung 6 dargestellten Rechromatographie an Cycloheptaamylose-Sepharose (s. II.2.4.2.2).

In **A** wurden die Ausgangsprobe der Rechromatographie (vereinigtes Eluat der Affinitätschromatographie an Cycloheptaamylose-Sepharose, **Ausg.**), das Filtrat (**Filt.**) und die Fraktionen **F28-F48** aufgetrennt und ihre stärkesynthetisierenden Aktivitäten wie in Abbildung 2 beschrieben nachgewiesen. **P1** und **P2** ebenfalls wie in Abbildung 2. **B** zeigt ein 7,5 %iges SDS-Gel der gleichen Proben, gefärbt mit Silbernitrat (II.2.4.4.2). **MW** = Molekulargewichtsmarker SDS 6H (Sigma).

III.1.1.3 Ist das 100 kD-Protein eine Phosphorylase?

Da das 100 kD-Protein nach der Reinigung keine Aktivität aufwies, war einerseits möglich, dass es sich bei diesem Protein nicht um eine Phosphorylase handelt. Andererseits könnte dieses Protein jedoch eine Phosphorylase sein, deren Aktivität bei der Reinigungsprozedur verlorengegangen war. Reinigungsversuche hatten angedeutet, dass das 100 kD-Protein dem 90 kD-Protein sehr ähnlich ist. Beide Proteine haben eine vergleichbare Nettoladung und zeigen sehr ähnliche pI-Formen. Um eine zuverlässige Aussage treffen zu können, ob es sich auch bei dem 100 kD-Protein um eine Phosphorylase handelt, wurden die Aminosäuresequenzen beider Proteine untersucht.

Zunächst wurde versucht, das 90 kD- und das 100 kD-Protein N-terminal anzu-sequenzieren. Beide Proteine erwiesen sich jedoch in der am Lehrstuhl für Biochemie I der Universität Bayreuth wie unter II.2.5.1.3 beschrieben durchgeführten Sequenzierung als N-terminal blockiert, daher wurden die Peptidmuster untersucht, die nach einer enzymatischen oder chemischen Spaltung des 90 kD- bzw. 100 kD-Proteins auftraten. Ihr Vergleich sollte zeigen, wie stark sich die beiden Proteine in ihrer Sequenz ähneln (Abbildung 8).

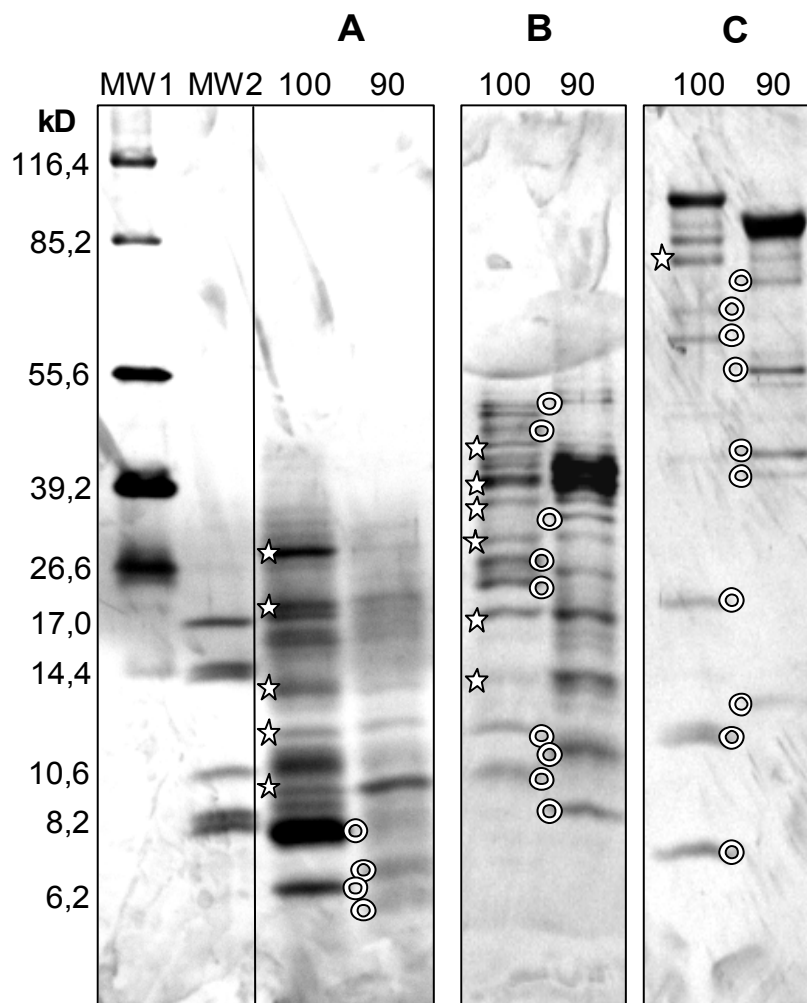


Abbildung 8: Peptidmuster des 100 kD- und des 90 kD-Proteins nach Proteolyse mit verschiedenen Spaltungsreagenzien.

Das 90 kD- und das 100 kD-Protein wurden zunächst, wie unter II.2.4.4.2 beschrieben, in einem 7,5 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Für die Spaltung mit Trypsin wurden die Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten und die Proteine im Gel gespalten (II.2.5.1.2). Für die Spaltungen mit BNPS-Skatol und NTCB wurden die zwei Proteinbanden nach Blotten auf eine PVDF-Membran (II.2.4.5) aus der Membran ausgeschnitten und auf der Membran gespalten (II.2.5.1.2). Anschließend wurden die Peptide von den Membranstücken eluiert. Nach jeder Spaltung wurden die Peptide in einem Tris-Tricin-Gel aufgetrennt und mit Silbernitrat wie unter II.2.4.4.2 beschrieben angefärbt.

A: enzymatische Spaltung mit Trypsin, **B:** chemische Spaltung mit BNPS-Skatol und **C:** chemische Spaltung mit NTCB. **90** bezeichnet das 90 kD-Protein, **100** das 100 kD-Protein, **MW1** ist der hochmolekulare Molekulargewichtsmarker von Boehringer Mannheim und **MW2** der niedermolekulare Molekulargewichtsmarker SDS-17S von Sigma. Ausgewählte Banden der Peptidmuster des 90 kD-Proteins und des 100 kD-Proteins einer Spaltung mit scheinbar ähnlichem Molekulargewicht sind mit einem **Stern** und Banden mit scheinbar abweichendem Molekulargewicht mit einem **Kreis** gekennzeichnet.

Es wurden drei verschiedene Spaltreagenzien benutzt. Die Peptidmuster der beiden Proteine nach Spaltung mit Trypsin (Abbildung 8 A), welches nach Arginin und Lysin spaltet, sind sich bis auf wenige Banden sehr ähnlich. Im Muster der Spaltung mit BNPS-Skatol (Abbildung 8 B), das nach Tryptophan spaltet, sind wesentlich mehr Banden zu beobachten, die sich in ihrem Molekulargewicht unterscheiden. Nach der Spaltung mit NTCB (Abbildung 8 C), welches vor der seltenen Aminosäure Cystein spaltet, lässt sich zwischen den beiden Peptidmustern keine Ähnlich-

keit mehr erkennen. Der Vergleich der berechneten Massen der NTCB-Spaltpeptide des 90 kD- und des 100 kD-Proteins unterstreicht die Verschiedenheit der Ausgangsproteine (Tabelle 10). Die Peptide des 90 kD-Proteins lassen sich recht gut der abgeleiteten Aminosäuresequenz der in III.4.3 beschriebenen cDNA-Sequenz einer cytosolischen Phosphorylase aus Weizen zuordnen. Für acht der neun Spaltpeptide konnten in der abgeleiteten Aminosäuresequenz Bereiche zwischen zwei Cysteinen gefunden werden, deren Masse mit den Spaltpeptiden übereinstimmte (Tabelle 10 und Abbildung 16). Die Peptide des 100 kD-Proteins lassen sich keiner der gefundenen cDNAs zuordnen.

Tabelle 10: Vergleich der Molekularmassen der Spaltprodukte des 90 kD- und des 100 kD-Proteins nach Spaltung mit NTCB und Zuordnung der Spaltprodukte des 90 kD-Proteins zu der Aminosäuresequenz der cytosolischen Weizenphosphorylase.

Die Massen der Peptide des 90 kD- und des 100 kD-Proteins wurden mit Hilfe der im Gel mitgelaufenen Markerproteine bestimmt. Die Peptide des 90 kD-Proteins wurden dann mit den anhand der abgeleiteten Aminosäuresequenz der cDNA-Sequenz *kV* (Abbildung 16) ermittelten Massen von Spaltpeptiden zwischen zwei Cysteinen verglichen und, wenn möglich, zugeordnet.

NTCB-Spaltpeptide des 100 kD-Proteins [kD]	NTCB-Spaltpeptide des 90 kD-Proteins [kD]	Anhand der Sequenz <i>kV</i> berechnete Masse [kD]	Entspricht der Aminosäuresequenz von <i>kV</i>
101,3			
	94,2	93,7	1-851
89,9			
83,3	83,3	79,1	155-851
	77,0	77,1	1-702
69,4			
63,1			
	58,5	60,3	315-847
	56,9	55,4	1-507
	53,9	?	?
50,6			
48,3			
	42,7	43,7	458-847
41,6			
	39,4	40,8 oder 38,4	155-507 oder 508-851
25,5			
	18,2	18,4	155-314
16,2			
10,8			

Als letzter Hinweis auf die Identität des 100 kD-Proteins sollten interne Sequenzen der beiden Proteine verglichen werden. Die BNPS-Skatol-Spaltung wurde ausgewählt, da ihre Spaltstücke weiter auseinander liegen als die der Trypsinspaltung, sie sind also einfacher aus der Membran zu schneiden. Darüber hinaus sind sie nicht blockiert wie die der NTCB-Spaltung, deren Spaltreaktion eine Blockierung des N-Terminus verursacht (Wu et al. 1996).

Die in einem Tris-Tricin-Gel (vgl. II.2.4.4.2) aufgetrennten Spaltprodukte sollten ansequenziert werden wie unter II.2.5.1.3 beschrieben. Es zeigte sich jedoch, dass in diesem Gelsystem, welches speziell für die Auftrennung kleiner Peptide entwickelt wurde, die Banden der BNPS-Skatol-Spaltung nicht scharf genug liefen, um für die

Ansequenzierung genutzt werden zu können. Auch eine Optimierung des Gel-systems durch verlängerte Polymerisierungs- und Laufzeiten und eine verbesserte Kühlung während des Laufs konnte die Auftrennung nicht verbessern. Es konnten keine internen Sequenzen der beiden Proteine gewonnen werden.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass nur das 90 kD-Protein Phosphory-laseaktivität zeigt und das 100 kD-Protein nicht. Bei dem 100 kD-Protein handelt es sich um ein Protein, welches eine dem 90 kD-Protein vergleichbare Nettoladung be-sitzt, ähnliche pI-Formen bildet und an Cycloheptaamylose bindet. Es hat jedoch ein anderes Peptidspaltmuster nach BNPS- und NTCB-Spaltung als das 90 kD-Protein, welches sich im Gegensatz zu dem des 90 kD-Proteins nicht zu der Aminosäurese-quenz der cytosolischen Phosphorylase KV zuordnen lässt.

III.1.1.4 Bilanz der Reinigung der cytosolischen Phosphorylase

Die präparative Aufreinigung der cytosolischen Phosphorylase ging meist von 100 g 7-8 Tage alten Weizenblättern aus. Der konzentrierte Rohextrakt wurde durch die Cycloheptaamylose-Sepharosesäule filtriert und gebundenes Protein mit gelöster Cycloheptaamylose eluiert. Die Fraktionen, die nachweislich nur das 90 kD-Protein enthielten (z.B. Fraktionen 10 bis 40, Abbildung 4), wurden vereinigt, ihr Volumen durch Ultrafiltration verringert und für die Charakterisierung verwendet (s. II.2.4.1.1).

Die Rechromatographie über eine zweite Cycloheptaamylose-Sepharosesäule diente hauptsächlich zur Aufreinigung des 100 kD-Proteins. Zur Reinigung der cyto-solischen 90 kD-Phosphorylase eignet sie sich nicht, da das Protein durch diesen weiteren Reinigungsschritt zu viel Aktivität verliert. Die Ausbeute an Phosphorylase verringert sich nach dieser Säule um mehr als 90 % von 32 % auf 3 % (vgl. Tabelle 11).

Tabelle 11: Anreicherung der Phosphorylase aus Weizenblättern im Verlauf eines präparativen Reinigungsverfahrens.

Die Werte der Phosphorylaseaktivität, Gesamtaktivität, spezifischen Phosphorylaseaktivität, Anreicherungsfaktor und Ausbeute sind Mittelwerte aus vier Reinigungen. Gemessen wurde die Aktivität in der phosphorolytischen Richtung mit Amylopektin als Substrat (s. II.2.5.2.1).

Reinigungsschritt	Volumen [ml]	Phosphory-laseaktivität [U/ml]	Protein [mg/ml]	Spezifische Aktivität [U/mg Protein]	Anreicherungs-faktor	Ausbeute [%]
Rohextrakt	223	0,025	3,2	0,008	1,0	100
Überstand 1. PEG-Fällung (0-5%)	240	0,024	3,2	0,007	0,9	103
Sediment der 2. PEG-Fällung (6-30%)	49	0,11	9,5	0,01	1,3	97
Dialyse	52	0,09	9,4	0,009	1,1	84
Eluat der 1. Cycloheptaamylose-Sepharose, eingeengt	2,9	0,56	0,013	43,08	5385	29
Entsalzung	4,4	0,40	0,007	57,14	7142	32
Eluat der Rechromatographie	4,0	0,04	0,007	5,71	714	3

In Tabelle 11 sind Mittelwerte aus vier Reinigungen der bei den einzelnen Schritten der Reinigungsprozedur erzielten Anreicherungsfaktoren und Ausbeuten aufgeführt. Die spezifische Aktivität der gereinigten und entsalzten Phosphorylase beträgt ca. 55 U/mg. Dies entspricht einer über 7000-fachen Anreicherung im Vergleich zur spezifischen Aktivität des Rohextraktes, wobei die Phosphorylaseaktivität des Rohextraktes zu einem geringen Teil auch von der plastidischen Phosphorylase gebildet wird (s. IV.1.1). Die scheinbare Zunahme der Ausbeute nach der 5 %-igen PEG-Fällung von 100 % auf 103 % wird höchstwahrscheinlich durch eine Erhöhung der Aktivität der Phosphorylase nach Ausfällung eines störenden Faktors verursacht. Die Entfernung des Inhibitors Cycloheptaamylose durch die Entsalzung des Eluates lässt die Ausbeute nach diesem Reinigungsschritt scheinbar von 29 % auf 32 % steigen. Die Endausbeute an gereinigter cytosolischer Phosphorylase beträgt 32 % der Phosphorylaseaktivität des Ausgangsrohextraktes. Das gereinigte Protein zeigt nach denaturierender Gelelektrophorese eine Polypeptidbande (Abbildung 9) und wurde somit zur Homogenität gereinigt.

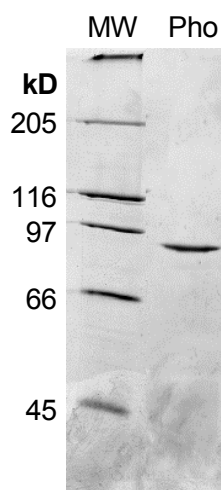


Abbildung 9: SDS-Gel-Analyse der gereinigten cytosolischen Phosphorylase.

Aufgetragen wurde in der Spur **MW** der Molekulargewichtsmarker SDS 6H (Sigma) und in der Spur **Pho** 2 µg gereinigte Phosphorylase. Gefärbt wurden die Proteine im Gel mit Silbernitrat, wie unter II.2.4.4.2 beschrieben.

III.1.2 Reinigung der plastidischen Phosphorylase

Zur Reinigung der plastidischen Phosphorylase wurde eine Vielzahl von Substanzen als Affinitätsmittel getestet. Diese waren alle, mit Ausnahme der Maltotriose, potenzielle Substrate der Phosphorylase (STEUP 1988). Der Großteil dieser Substanzen wurde nach der Methode von VRETBLAD (1974) an epoxyaktivierte Sepharose gekoppelt. Ausnahmen bildeten das Amylose Resin und das Amylopektin. Sie wurden als Gesamtmatrix im Batch-Verfahren nach HAGENDORFF et al. (1995) verwendet. Die getesteten Substanzen waren:

Lösliche Stärke	Maltotriose
Amylose Resin	Maltotetraose
Amylopektin	Maltopentaose
Glycogen	Maltohexaose
Dextrin 10	Maltoheptaose

Als Ausgangsprobe für die Affinitätschromatographien diente das Filtrat der Cycloheptaamylose-Säule (s. II.2.4.2.1), das nur noch die plastidische und keine cytosolische Phosphorylaseaktivität mehr zeigte (vgl. Abbildung 2). Die Filtrate und die meist mit Dextrin 10 eluierten Fraktionen der einzelnen Affinitätsmatrizes wurden mit Aktivitätsgelen auf Vorkommen von Phosphorylaseaktivität hin analysiert (s. II.2.4.2.3 und II.2.4.4.1). Nur an Amylopektin und an das Amylose Resin bindet die plastidische Phosphorylase. Untersuchungen der eluierten Fraktionen ergaben, dass mit der Phosphorylase eine große Anzahl anderer Proteine an diese Substanzen binden, so dass es nicht möglich war, ein bestimmtes Protein zu erkennen, welches während der jeweiligen Prozedur angereichert wurde (nicht abgebildet).

Nachdem die Affinitätschromatographien keinen Erfolg brachten, wurden konventionelle chromatographische Methoden mit dem Filtrat der Cycloheptaamylose-Sepharosesäule als Ausgangsmaterial getestet. An zwei der getesteten Säulenmaterialien band die plastidische Phosphorylase. Zum einen an den Anionenaustauscher Q-Sephrose (s. II.2.4.2.3), auch hier enthielten die eluierten Fraktionen eine Vielzahl von Proteinen. Es ließ sich jedoch eine Proteinbande mit der für plastidische Phosphorylasen typischen Größe über 100 kD erkennen (STEUP 1988), die mit dem Auftreten von Phosphorylaseaktivität korreliert werden konnte (s. Abbildung 10, „Ausg.“, mit einem Pfeil gekennzeichnet). Das andere Material, an welche das Protein mit plastidischer Phosphorylaseaktivität band, war eine Säule aus Phenyl Sepharose, die zur hydrophoben Interaktionschromatographie eingesetzt wird (s. II.2.4.2.3). Auch hier konnte eine Anreicherung eines Proteins der erwarteten Größe über 100 kD beobachtet und mit dem Auftreten von plastidischer Phosphorylaseaktivität korreliert werden (nicht abgebildet). In den Elutionsfraktionen befanden sich neben dieser Proteinbande ebenfalls viele weitere Proteine.

Es wurde versucht, eine verbesserte Reinigung durch die Kombination von Anionenaustauschchromatographie und hydrophober Interaktion zu erreichen. Die beiden Methoden wurden hierfür nacheinander ausgeführt, wie unter II.2.4.2.3 beschrieben. In den Elutionsfraktionen der der Anionenaustauschchromatographie nachgeschalteten Phenyl Sepharose-Chromatographie, die Phosphorylaseaktivität zeigten, sind deutlich weniger Proteine enthalten als nach der ersten Chromatographie (vgl. Abbildung 10 B, „Ausg.“ und F17-F20). Allerdings zeigte sich, dass nach dieser insgesamt dritten Chromatographie, nur noch sehr wenig Aktivität der plastidischen Phosphorylase nachweisbar ist. Aufgrund des Aktivitätsverlustes während der Reinigungsprozedur war es nicht möglich, das aus Weizenblättern angereicherte Protein weiter aufzureinigen.

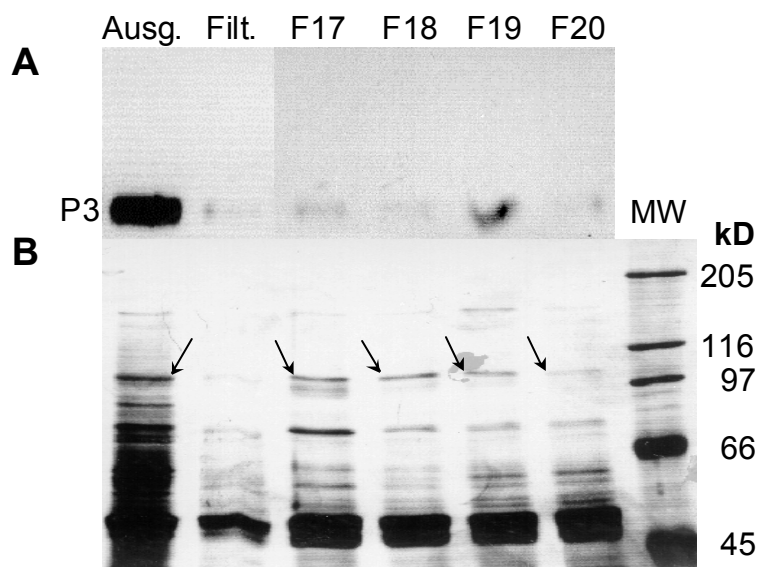


Abbildung 10: Phosphorylaseaktivität (A) und Proteinausstattung (B) der Ausgangsprobe, des Filtrates und ausgewählter Fraktionen nach hydrophober Interaktionschromatographie der durch Anionenaustauschchromatographie vorgereinigten plastidischen Phosphorylase.

In **A** wurde das Ausgangspräparat (**Ausg.**) der hydrophoben Interaktionschromatographie, welches aus den Elutionsfraktionen einer wie unter II.2.4.2.3 beschriebenen durchgeführten Anionenaustauschchromatographie bestand, die plastidische Phosphorylaseaktivität zeigten, aufgetrennt und die stärkesynthetisierenden Aktivitäten wie in Abbildung 2 beschrieben, nachgewiesen. Weitere Proben waren das Filtrat (**Filt.**) der hydrophoben Interaktionschromatographie-Säule Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (Pharmacia) und die Elutionsfraktionen **F17-F20**. **P3** bezeichnet die Aktivität der plastidischen Phosphorylase. **B** zeigt ein 7,5 %iges SDS-Gel der gleichen Proben, gefärbt mit Silbernitrat (II.2.4.4.2). Die Pfeile zeigen auf das angereicherte Protein um 105 kD, welches mit plastidischer Phosphorylaseaktivität in den Fraktionen korreliert werden konnte. **MW** = Molekulargewichtsmarker SDS 6H (Sigma).

III.2 CHARAKTERISIERUNG DER CYTOSOLISCHEN PHOSPHORYLASE AUS WEIZENBLÄTTERN

Eine Affinitätschromatographie an Cycloheptaamylose ermöglichte die Reinigung der cytosolischen Phosphorylase aus Weizenblattrohextrakten (s. III.1.1). Nach isoelektrischer Fokussierung zeigte die cytosolische Phosphorylase drei unterschiedliche Aktivitätsbanden mit den eng beieinander liegenden pI-Werten von 5,95, 5,88 und 5,75 (Abbildung 5, S. 52). Im nicht-denaturierenden, Glycogen-haltigen Gel bildete sie nach geeigneter Inkubation (s. II.2.4.4.1) zwei Aktivitätsbanden. Eine dieser Banden (P1) besitzt eine hohe Affinität zu Glycogen und dringt nur wenig in das Gel ein (vgl. Abbildung 4, S. 50). Die andere Bande (P2) hat eine geringere Affinität zu Glycogen und wandert weiter im Gel. Verwendet man ein Gel ohne einpolymerisiertes Glycogen, so ist nur eine Aktivitätsbande auf Höhe der Phosphorylaseform P2 zu erkennen (nicht abgebildet).

Neben diesen strukturellen Merkmalen des Proteins wurden seine katalytischen Eigenschaften näher untersucht. Hierbei interessierten hauptsächlich die Substratpräferenz der Phosphorylase (III.2.2) und deren Abhängigkeit vom pH-Wert (III.2.3).

Zur Bestimmung der Enzymaktivitäten dienten diejenigen Fraktionen der Cycloheptaamylosesäule, die nur das 90 kD-Protein enthielten und die Haupt-Phosphorylaseaktivität zeigten (vgl. II.2.4.2.1). Wie in III.1.1.4 beschrieben, wurden diese Fraktionen vereinigt und für die Aktivitätsbestimmungen verwendet.

III.2.1 Molekulargewichtsbestimmung

Das Molekulargewicht der cytosolischen Phosphorylase wurde mit drei verschiedenen Markerproteinkombinationen bestimmt. Es war auffällig, dass der Wert je nach verwendeten Markerproteinen stark schwankte. So wurde in je sechs unabhängigen Bestimmungen im 12,5%igen SDS-Gel mit dem Molekulargewichtsmarker von Boehringer Mannheim ein Molekulargewicht der cytosolischen Phosphorylase von 94,4 +/- 1 kD ermittelt, mit dem Marker SDS 6H von Sigma eines von 91,5 +/- 2 kD und mit dem Marker SilverStain High Range von BioRad eines von 88,9 +/- 2 kD.

III.2.2 Aktivität in Abhängigkeit vom Substrat

Die pflanzliche α -1,4-Glucan-Phosphorylase zeigt zwei Aktivitäten. Sie kann G1P sowohl von einer Glucosekette abspalten, als auch an eine Glucosekette anpolymersieren. Diese Aktivitäten wurden mit einer Reihe von Substraten getestet, um die Präferenz der beiden Enzymreaktionen festzustellen. Als hochmolekulare verzweigte Glucane wurden Amylopektin und Glycogen verwendet, als kleineres verzweigtes Molekül lösliche Stärke, als Vertreter hochmolekularer, nicht verzweigter Glucane Amylose und als kleine, unverzweigte Moleküle Maltoheptaose und Maltotetraose. Alle diese Glucane, mit Ausnahme der Maltotetraose, konnte das Enzym sowohl in der abbauenden als auch in der synthetisierenden Reaktion als Substrat verwenden. Allein von Maltotetraose konnte die Phosphorylase keine Glucose mehr abspalten. In der Synthese konnte sie jedoch als Primermolekül genutzt werden und ist damit für diese Reaktionsrichtung das kleinste Substrat. Es konnte festgestellt werden, dass das kleinste Glucan, welches die cytosolische Phosphorylase aus Weizen abbauen kann, Maltopentaose ist.

In Abbildung 11 ist exemplarisch die abbauende Aktivität und die synthetisierende Aktivität der Phosphorylase (Abbildung 11 B) an einem verzweigten Polyglucan (Amylopektin), an einem kürzerkettigen Polyglucan (lösliche Stärke) und an einem nicht verzweigten Oligosaccharid (Maltoheptaose) gezeigt. Die Abbildung veranschaulicht, dass die phosphorolytische Aktivität der Phosphorylase mit den gezeigten Substraten ähnlich hohe Umsatzmaxima erreicht (Abbildung 11 A). Die Anfangssteigung ist jedoch verschieden steil, sie ist mit Amylopektin am steilsten und mit Maltoheptaose am flachsten. Die in der Syntheserichtung erreichten Umsatzmaxima mit Amylopektin und mit Maltoheptaose sind ca. fünfmal höher als in der Abbaurichtung, nur das Maximum mit Stärke erreicht einen ähnlichen Wert. Die An-

fangssteigungen in der Syntheserichtung verhalten sich wie diejenigen der abbauenden Reaktionsrichtung. Allerdings ist die Anfangssteigung der Synthesereaktion mit dem Substrat Maltoheptaose wesentlich geringer als die der Phosphorolyse und der Bereich der Sättigung wird erst bei wesentlich höheren Konzentrationen von 30 mg/ml erreicht. Diese werden zum Erhalt der Proportion des Graphen hier nicht gezeigt.

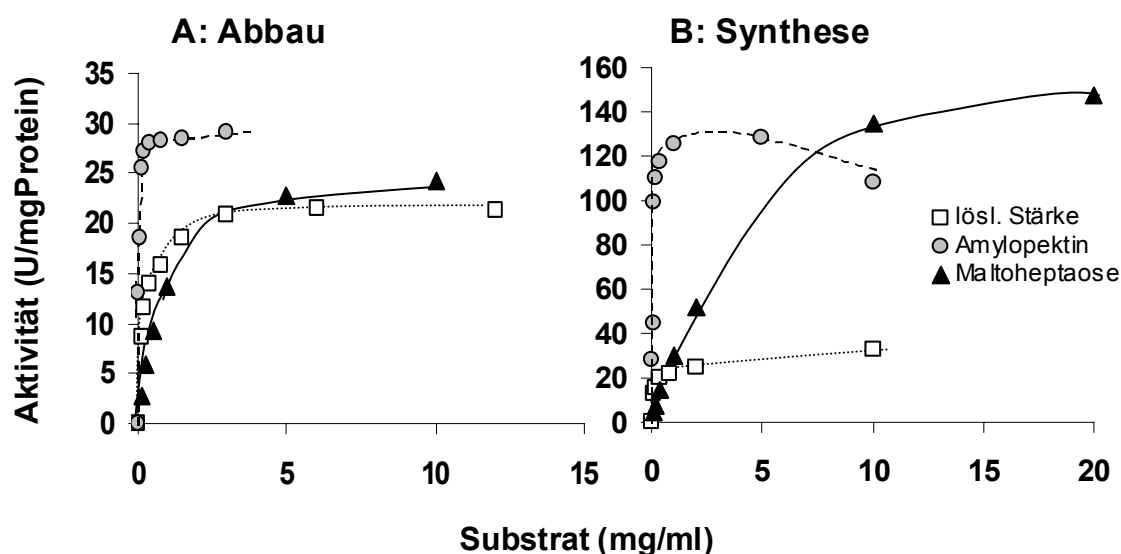


Abbildung 11: Phosphorolytische Aktivität (A) und synthetisierende Aktivität (B) der cytosolischen Phosphorylase aus Weizenblättern in Abhängigkeit vom angebotenen Substrat.

Zur Bestimmung der phosphorolytischen Aktivität wurde das gebildete G1P mit Hilfe des gekoppelten optischen Tests gemessen (s. II.2.5.2.1). Die synthetisierende Aktivität wurde durch Messung des freigesetzten Phosphats bestimmt (s. II.2.5.2.2). Die Phosphatkonzentration bei Bestimmung der phosphorolytischen Aktivität wurde konstant bei 25 mM und die G1P-Konzentration bei Bestimmung der synthetisierenden Aktivität konstant bei 10 mM gehalten (II.2.5.2.2).

In Tabelle 12 sind die apparenten K_M -Werte und Geschwindigkeitsmaxima der eingesetzten Substrate aufgelistet. Die Einheit des K_M -Wertes, der ein Maß für die Affinität eines Enzyms zu einem Substrat darstellt, ist normalerweise Molar (M). Da hier aber als Substrate hauptsächlich Stoffe verwendet wurden, die kein einheitliches Molekulargewicht haben, wie Amylopektin, Glycogen, Amylose und lösliche Stärke wurde der apparente K_M -Wert in mg/ml angegeben. Die K_M -Werte der Substrate mit einem definierten Molekulargewicht, Maltoheptaose und Maltotetraose, wurden zum einfacheren Vergleich ebenfalls in mg/ml angegeben.

Auffällig ist zunächst, dass sich die Umsatzgeschwindigkeiten (V_{max} -Werte) einer Reaktionsrichtung mit den verschiedenen Substraten nur wenig voneinander unterscheiden. Sie liegen für die Phosphorolyse mit 20 bis 30 U/mg Protein relativ nah beieinander, schwanken also um ca. 30 %. Die höchste Geschwindigkeit wird mit Amylose und Amylopektin erreicht, die niedrigste mit Glycogen und löslicher Stärke. In der Syntheserichtung schwanken die Werte ebenfalls um ca. 30 %, sie sind jedoch

vier- bis siebenmal höher als in der Phosphorolyse und liegen zwischen 128 und 175 U/mg Protein. Eine Ausnahme bildet das mit löslicher Stärke in der Synthesereaktion erreichte Umsatzmaximum. Es liegt fünf- bis siebenmal niedriger als die ansonsten in der Syntheserichtung gemessenen Geschwindigkeiten und ist somit ungefähr so groß wie die V_{\max} -Werte der Phosphorolyse.

Tabelle 12: Apparente Michaelis-Menten-Konstanten (K_M) der cytosolischen Phosphorylase aus Weizenblättern für die verschiedenen Substrate.

Die Phosphatkonzentration bei Bestimmung der phosphorolytischen Aktivität wurde konstant bei 25 mM und die G1P-Konzentration wurde bei Bestimmung der synthetisierenden Aktivität konstant bei 10 mM gehalten (II.2.5.2.2).

Substrat	app. K_M Abbau [mg/ml]	V_{\max} Abbau [U/mg Prot.]	app. K_M Synthese [mg/ml]	V_{\max} Synthese [U/mg Prot.]
Amylopektin	0,03	30	0,03	128
Glycogen	0,04	21	0,07	145
Stärke, löslich	0,15	21	0,10	26
Amylose	0,71	30	3,01	128
Maltoheptaose	0,81	25	4,49	175
Maltotetraose	keine Aktivität	keine Aktivität	0,44	166

Im Vergleich zu den Reaktionsgeschwindigkeiten unterscheiden sich die Affinitätskonstanten (K_M -Werte) stärker. Die Konstanten für verzweigte Substrate sind in beiden Reaktionsrichtungen wesentlich kleiner als die für unverzweigte Substrate. Der niedrigste Wert von 0,03 mg/ml wird sowohl in der Abbau- als auch in der Synthesereaktion mit Amylopektin erreicht. Unter den getesteten Substraten hat die cytosolische Phosphorylase demnach die höchste Affinität zu Amylopektin. Die Affinität zu Glycogen ist nur halb so groß und diejenige zu löslicher Stärke noch etwas geringer. Es werden demnach die großen gegenüber den kleineren verzweigten Substraten bevorzugt. Die Affinitätskonstanten für die verzweigten Substrate der zwei Reaktionsrichtungen unterscheiden sich kaum. Dies ist bei den unverzweigten Substraten nicht der Fall. Hier sind die K_M -Werte in der abbauenden Richtung sehr viel kleiner als in der synthetisierenden Richtung. So ist der K_M -Wert für Amylose in der Phosphorolyse zwar über 24-mal größer als für Amylopektin, aber noch viermal kleiner als für Amylose in der Synthesereaktion. Die geringste Affinität hat die cytosolische Phosphorylase in beiden Reaktionsrichtungen zu Maltoheptaose, wobei auch hier der K_M -Wert in der Synthese sehr viel höher ist als in der Phosphorolyse. Dies deutet eine Abnahme der Affinität mit abnehmender Kettenlänge an. Eine Ausnahme bildet jedoch die Maltotetraose. Zu diesem Substrat hat die cytosolische Phosphorylase in der Synthese eine zehnmal höhere Affinität als zu Maltoheptaose. Die K_M -Werte für die Substrate Phosphat und G1P liegen bei 2,1 mM bzw. 0,7 mM mit maximalen Umsatzgeschwindigkeiten von 17 U/mg Protein bzw. 150 U/mg Protein. Die mit Phosphat erreichte Umsatzgeschwindigkeit in der Phosphorolyse ist somit gerin-

ger als mit anderen Substraten, während die mit G1P in der Syntheserichtung erreichte Geschwindigkeit im oberen Bereich der gemessenen Geschwindigkeiten liegt.

III.2.3 Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert

Die pH-Abhängigkeit der gereinigten cytosolischen Phosphorylase aus Weizenblättern wurde ermittelt. Dafür wurde die abbauende und synthetisierende Aktivität des Enzyms im pH-Bereich zwischen pH 4,0 und 9,0 bestimmt. Als Substrat diente 1 mg Amylopektin/ml, welches sich als bevorzugtes Substrat des Enzyms gezeigt hatte (s. III.2.2).

In Abbildung 12 A ist zu erkennen, dass die Phosphorylase ihr Optimum für den Abbau zwischen pH 6,0 und 8,0 erreicht, mit einem maximalen Wert bei pH 7,0. Bei pH 5,0 ist fast keine Aktivität messbar. Der optimale pH-Bereich der Phosphorylase für die Synthese liegt dagegen zwischen pH 5,0 und 7,0, mit einer maximalen Aktivität bei pH 6,0 (Abbildung 12 B). Bei pH 8,0 weist das Enzym nur noch ein Drittel seiner Aktivität auf. Verglichen mit der abbauenden Reaktion ist das pH-Optimum der synthetisierenden Reaktion demnach deutlich ins Saure verschoben. Bei pH 8,0 gibt es einen Unterschied in der gemessenen Aktivität von 30 % zwischen der mit Imidazol bestimmten Aktivität und der mit BTP bestimmten. Die erreichten Umsatzmaxima in der Synthese sind, wie unter III.2.2 beschrieben, auch hier ca. fünfmal höher als in der Phosphorolyse.

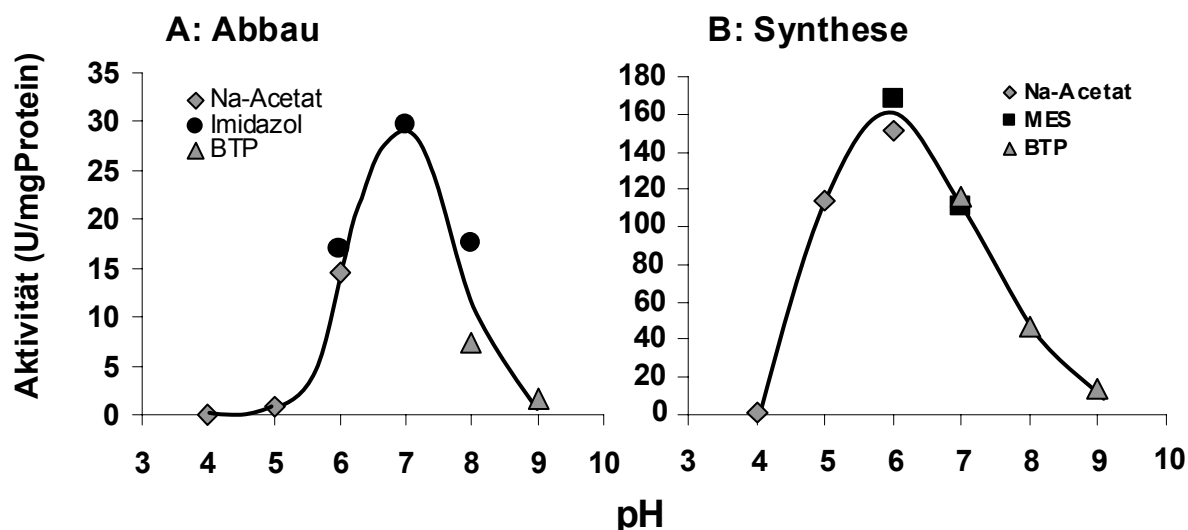


Abbildung 12: Phosphorolytischer Amylopektinabbau (A) und synthetisierende Aktivität (B) der cytosolischen Phosphorylase aus Weizenblättern in Abhängigkeit vom pH-Wert des Reaktionsansatzes.

Die verschiedenen, in der Legende beschriebenen Symbole repräsentieren den zur Einstellung des jeweiligen pH-Wertes verwendeten Reaktionspuffer. Durchführung der Bestimmung des pH-Optimums wie unter II.2.5.2 beschrieben.

III.2.4 Einfluss von Thiolen

Für mehrere Enzyme des Stärkestoffwechsels, wie z.B. das R-Enzym oder die β -Amylase, konnten Aktivitätsänderungen durch das Einwirken von Thiolen festgestellt werden (HENKER et al. 1998, OKAMOTO & AKAZAWA 1978). Zur Überprüfung der Wirkung von Thiolen auf die cytosolische Phosphorylase wurden den Reaktionsansätzen zur Bestimmung ihrer abbauenden (s. II.2.5.2.1) und ihrer synthetisierenden Aktivität (s. II.2.5.2.2) Thiole in steigender Konzentration zugesetzt. Die Aktivität des Enzyms ließ sich weder durch DTT, β -Mercaptoethanol noch durch reduziertes Glutathion beeinflussen.

III.2.5 Einfluss des 100 kD-Proteins auf die cytosolische Phosphorylase

Während der Reinigung ließ sich das 100 kD-Protein schwer von der cytosolischen Phosphorylase trennen. Dieses Protein zeigt keine Phosphorylaseaktivität (vgl. III.1.1.3). Es bestand jedoch der Verdacht, dass das 100 kD-Protein ein Modulator der Aktivität der Phosphorylase sein könnte, sie also möglicherweise inhibiert oder aktiviert.

Elutionsfraktionen der Cycloheptaamylosesäule, die nur das 100 kD-Protein enthielten (s. Abbildung 4), wurden vereinigt, konzentriert und in zunehmenden Mengen zu den Reaktionsansätzen zur Bestimmung der abbauenden oder der synthetisierenden Aktivität des 90 kD-Proteins gegeben. Es zeigte sich, dass weder die phosphorolytische noch die synthetisierende Aktivität der cytosolischen Phosphorylase durch das 100 kD-Protein positiv oder negativ beeinflusst wurde.

III.3 GEWINNUNG VON ANTIKÖRPERN GEGEN DIE CYTOSOLISCHE PHOSPHORYLASE

Um das cytosolische Phosphorylaseprotein in Proteinextrakten quantifizieren zu können, wurden Antikörper hergestellt. Mit der Gewinnung der Antikörper wurde begonnen, bevor es möglich war, große Mengen der cytosolischen Phosphorylase und damit des 90 kD-Proteins ohne das 100 kD-Protein präparativ zu reinigen (vgl. III.1.1.1). Daher wurde die Herstellung der Antikörper zunächst mit aus dem SDS-Gel ausgeschnittener cytosolischer 90 kD-Phosphorylase als Antigen versucht (s. II.2.6.1). Gegen dieses bildete das gewählte Kaninchen keinerlei Antikörper. Daraufhin wurde ein weiteres Kaninchen mit dem Eluat der Cycloheptaamylose-Sepharosesäule, welches die cytosolische Phosphorylase und etwas 100 kD-Protein in Lösung enthielt, immunisiert.

Abbildung 13 zeigt die Reaktion des Präimmunserums des Kaninchens und des Antiserums der letzten Blutentnahme mit ausgewählten Weizenblattextrakten. Das Präimmunserum zeigt eine kaum sichtbare Kreuzreaktivität mit Proteinen der Weizenblattextrakte und reagiert nicht mit der Probe der cytosolischen Phosphorylase und des 100 kD-Proteins (Abbildung 13 A). Es reagiert allerdings mit einem der Markerproteine, der Phosphorylase b aus Kaninchenmuskel mit 97,4 kD (Pfeil 1).

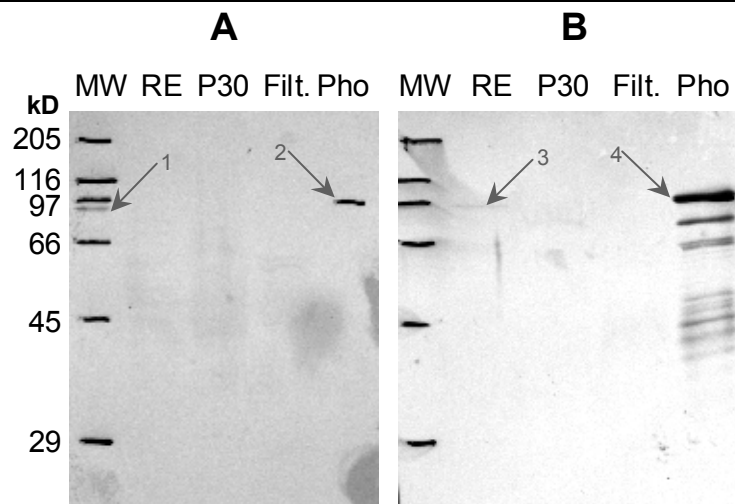


Abbildung 13: Westernblot nach SDS-PAGE 12,5 %iger Gele von verschiedenen Weizenblattextrakten, inkubiert mit Präimmunserum (A) und Antiserum (B).

Die auf PVDF-Membran geblotteten Proteine wurden in **A** mit 1:250 in TBS verdünntem Präimmunserum und in **B** mit 1:1000 in TBS verdünntem Antiserum der letzten Blutentnahme inkubiert (II.2.6.2). Die Positionen der einzelnen Markerproteine (**MW**) wurden anhand der PonceauS-gefärbten Membran mit Kugelschreiber nachgezogen (vgl. II.2.4.5). Außerdem wurde aufgetragen: je 10 µl eines Rohextraktes aus Weizenblättern (**RE**), des mit 30 % PEG konzentrierten Rohextraktes (**P30**), des Filtrates der Cycloheptaamylose-Sepharosesäule, welches nur die plastidische Phosphorylase enthielt (**Filt.**), und 0,5 µg Protein des Eluates dieser Säule, welches cytosolische Phosphorylase und 100 kD-Protein enthielt (**Pho**). Die nummerierten Pfeile kennzeichnen eine Reaktion des Präimmunserums mit dem Markerprotein Phosphorylase b aus Kaninchenmuskel (**1**), auf die mit Kugelschreiber gekennzeichnete Laufhöhe der cytosolischen Phosphorylase (**2**), auf eine Reaktion des Antiserums mit einem Protein im Rohextrakt (**3**) und mit der cytosolischen Phosphorylase (**4**).

Das Serum der dritten Blutentnahme reagiert leicht mit einem Protein des Rohextraktes, welches ein der cytosolischen Phosphorylase vergleichbares Molekulargewicht um 92 kD besitzt (Abbildung 13 B, Pfeil 3). Diese Reaktion findet sich nicht in der Bahn des mit 30 % PEG konzentrierten Rohextraktes (P30), obwohl die Proteinkonzentration hier fünffach erhöht ist. Die Reaktion mit einem Protein um 92 kD erscheint ebenfalls nicht im Durchlauf der Cycloheptaamylosesäule (Filt.), welcher nur die plastidische Phosphorylase enthält (vgl. Abbildung 2, S. 49). In keiner der Bahnen ist eine Reaktion mit einem Protein um 100 kD zu sehen. Dies bedeutet, dass das Antiserum anscheinend nur die cytosolische Phosphorylase erkennt, aber weder mit dem 100 kD-Protein, noch mit der plastidischen Phosphorylase reagiert. Das Signal mit dem Eluat der Cycloheptaamylose-Sepharosesäule, welches das 100 kD-Protein und die cytosolische Phosphorylase enthielt, ist sehr stark. Neben der ursprünglichen Proteinbande der Phosphorylase um 92 kD (Abbildung 13, Pfeil 4) werden von dem Antiserum noch viele kleinere Banden erkannt. Es handelt sich hier höchstwahrscheinlich um Abbauprodukte des Phosphorylaseproteins, da sie auch im Laufe der Reinigungsprozedur oder nach längerer Lagerung des gereinigten Proteins beobachtet wurden.

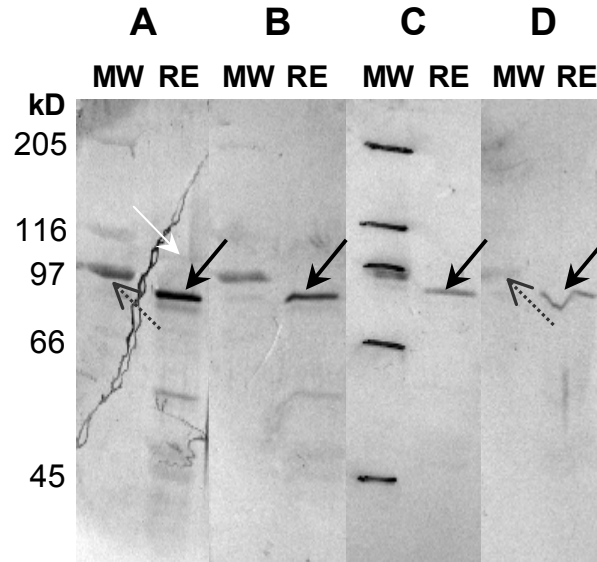


Abbildung 14: Westernblot nach SDS-PAGE 7,5 %iger Gele von Weizenblattrohextrakt, inkubiert mit verschiedenen Antiserumkonzentrationen.

Immunprinting der auf PVDF-Membran geblotteten Proteine eines Weizenblattrohextraktes mit dem Antiserum gegen die cytosolische Phosphorylase. Gezeigt sind vier verschiedene Antiserumkonzentrationen (**A-D**). **MW** bezeichnet den Molekulargewichtsmarker SDS-6H (Sigma), **RE** bezeichnet 12,5 µg Rohextraktprotein. Die Verdünnung des Antiserums war in **A** 250-fach, in **B** 500-fach, in **C** 750-fach und in **D** 1000-fach in TBS. Die Inkubationszeit für die Farbentwicklung betrug ca. 30 min. Der schwarze Pfeil kennzeichnet die gefärbte Proteinbande der cytosolischen Phosphorylase. Der weiße Pfeil kennzeichnet ein schwach angefärbtes Protein um 100 kD im Rohextrakt und die gepunkteten Pfeile Anfärbungen des Markerproteins Phosphorylase b aus Kaninchenmuskel. In **C** wurden die Banden des Markers mit Kugelschreiber auf der Membran gekennzeichnet.

Zur Überprüfung der Spezifität des Antiserums wurden Rohextraktproben mit dem Antiserum in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Die höchste Antiserumkonzentration von 1:250 zeigt im Immunprinting neben der Bande der cytosolischen Phosphorylase (Abbildung 14 A, schwarze Pfeile) noch eine Reihe weiterer, meist kleinerer Banden. Eine größere Bande um 100 kD ist zu erkennen, die der plastidischen Phosphorylase oder dem 100 kD-Protein entsprechen könnte (mit dem weißen Pfeil gekennzeichnet). In dieser hohen Konzentration reagiert das Serum auch mit allen Markerproteinen mit Ausnahme des 45 kD-Markers. Wird die Konzentration verringert, so sind die meisten der Banden nicht mehr zu sehen. Bei einer Antiserumkonzentration von 1:1000 ist außer der Reaktion mit der Phosphorylase keine andere Bande zu erkennen (Abbildung 14 D). Die Färbung eines Proteins um 100 kD ist schon bei der Verdünnung 1:500 nicht mehr detektierbar (Abbildung 14 B). Wie schon oben beschrieben, bleibt bei allen Antiserumkonzentrationen eine schwache Reaktion mit dem 97,4 kD-Markerprotein erhalten (Abbildung 14, gepunkteter Pfeil). Dieses ist die Phosphorylase b aus Kaninchenmuskel, welche eine Ähnlichkeit von 45 % mit der Weizenphosphorylase hat.

III.4 ISOLIERUNG VON cDNAs VON PHOSPHORYLASEGENEN

Durch die Untersuchung von Sequenzen der Weizen-Phosphorylasen können Informationen über die Struktur der Proteine und zur Herstellung von Sonden zur Analyse der Genexpression gewonnen werden. Zu dem Zeitpunkt, als diese Arbeit begonnen wurde, waren nur zwei cytosolische und vier plastidische Phosphorylase-sequenzen bekannt (Abbildung 15). Keine davon stammte aus einem Getreide. Es wurde daher zunächst eine Sonde hergestellt, die geeignet für die Identifizierung von pflanzlichen Phosphorylasegenen war und mit welcher eine cDNA-Bank aus Weizen gescreent werden konnte (III.4.1). Ausgangsmaterial für die Sonden- und die cDNA-Bank-Herstellung waren vier Tage alte Blätter von *Triticum aestivum* L. var. Star (III.4.2). Eine Analyse der identifizierten Klone für cytosolische und plastidische Phosphorylasen ist unter III.4.3 und III.4.5 zu finden. Die Untersuchung des 5'-Endes der cytosolischen Phosphorylase ist in III.4.4 beschrieben.

III.4.1 Konstruktion einer Phosphorylasesonde

Durch Vergleich der bekannten Peptidsequenzen der Phosphorylasen aus Kartoffel (*Solanum tuberosum*), Süßkartoffel (*Ipomoea batatas*), Saubohne (*Vicia faba*) und Spinat (*Spinacia oleracea*) konnten mehrere konservierte Regionen über die gesamte Sequenz verteilt gefunden werden (einige Beispiele sind in Abbildung 15, 1-4, zu sehen). Diese Sequenzen wurden auf ihre Eignung zur Herstellung degenerierter Primer untersucht. Degenerierte Primer waren nötig, da die Phosphorylase-sequenzen von Pflanzen stammten, die nicht mit Weizen verwandt sind. Die Nukleotidsequenz der konservierten Regionen wurde zunächst unter Beachtung der „codon usage“ von Weizen dahingehend untersucht, wieviele Aminosäuren durch mehrere Basen-Triplets codiert wurden. Es wurden sechs konservierte Peptidregionen gefunden, die möglichst wenig degeneriert waren (zwei davon (1 und 4) sind in Abbildung 15 gezeigt). Deren Konsensus-Nukleotidsequenz wurde auf ihre Eignung als Grundlage von Primern geprüft. Die Länge der Sequenz und ihr GC-Gehalt wurden untersucht. Da zwei Primer für eine Amplifizierung benötigt werden, musste eine zu dem ersten Primer passende Region für den Gegenprimer gefunden werden. Anhand der sechs konservierten Regionen wurden drei Primerpaare entworfen: F1/R1, F6/R3 und F13/R9 (vgl. Tabelle 3, S. 13). Sie wurden in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt, um ihr Vermögen, an Phosphorylase-sequenzen zu binden, zu testen. Als Matrize für die Primer wurde aus vier Tage alten Blättern gewonnene polyadenylierte RNA (s. II.2.3.12) zunächst durch reverse Transkription zu einem cDNA/RNA-Hybrid ergänzt (vgl. II.2.3.13) und dann in der PCR eingesetzt.

Nur eine Kombination, die der Primer F13 und R9, lieferte mehrere Nukleinsäurefragmente mit Längen zwischen 300 und 500 bp. Die Ansequenzierung dieser Produkte zeigte, dass neben einem Fragment mit Homologie zu einer Pentose-5-Phosphat-Epimerase, einem Fragment mit Homologie zu einem Sulfattransporter und einem Fragment mit Homologie zu einer Cysteinsynthase auch ein Fragment (*t_aes_cyt*) mit Homologie zu bekannten α -Glucan-Phosphorylasen amplifiziert wurde. Bezeichnungen von Nukleinsäuresequenzen sind ab hier mit kleinen Buchstaben und kursiv gekennzeichnet, die der von ihnen abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit großen Buchstaben und aufrechter Schrift.

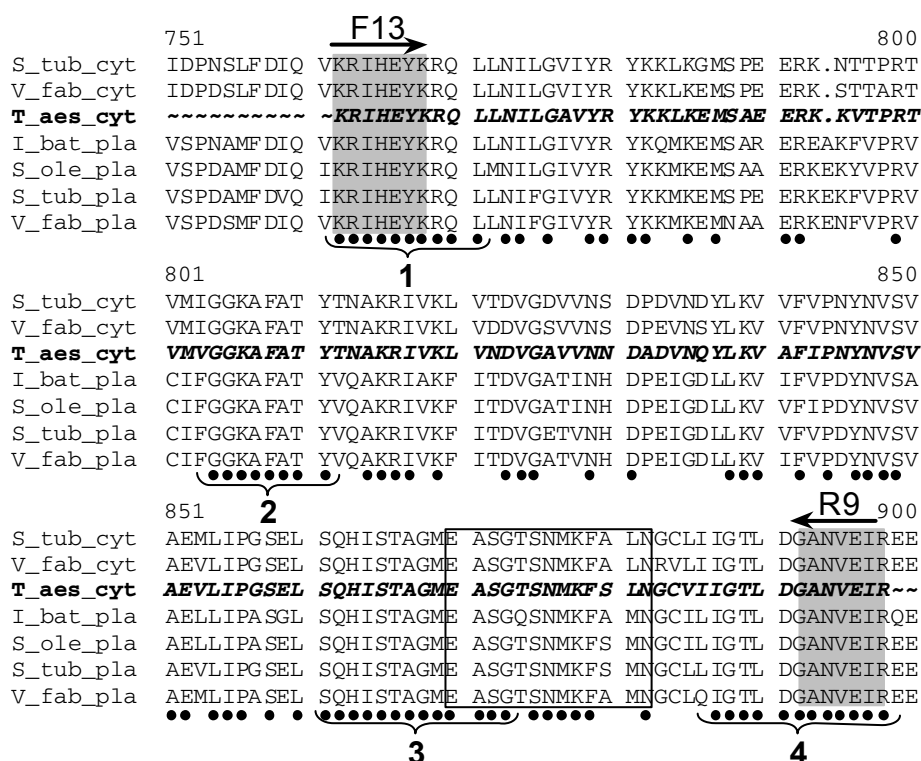


Abbildung 15: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen bekannter pflanzlicher Phosphorylasen und des amplifizierten Fragments einer cytosolischen Phosphorylase aus Weizenblättern.

In allen Sequenzen identische Aminosäuren sind mit • gekennzeichnet. 1 bis 4 bezeichnen konservierte Regionen. Die grau unterlegten Regionen 1 und 4 eigneten sich als Vorlage zur Konstruktion degenerierter Primer. Die Pfeile bezeichnen diese Primer. Die Pfeilspitze entspricht dem 3'-Ende des Primers. Die kursiv und fett gedruckte Sequenz von *Triticum aestivum* entspricht dem durch die degenerierten Primer anhand der polyadenylierten RNA amplifizierten Fragment. Die Pyridoxal-Phosphat-Bindungsstelle ist umrahmt.

S_tub_cyt = cytosolische Sequenz aus *Solanum tuberosum*, (M69038)

V_fab_cyt = cytosolische Sequenz aus *Vicia faba*, (Z35117)

T_aes_cyt = Fragment der cytosolischen Sequenz aus *Triticum aestivum*

I_bat_pla = plastidische Sequenz aus *Ipomoea batatas*, (M64362)

S_ole_pla = plastidische Sequenz aus *Spinacia oleracea*, (X85181)

S_tub_pla = plastidische Sequenz aus *Solanum tuberosum*, (Z73684)

V_fab_pla = plastidische Sequenz aus *Vicia faba*, (Z36880)

Die Zugangsnummern („Accession number“) der Datenbanksequenzen sind in Klammern angegeben.

t_aes_cyt hat eine Länge von 390 bp und codiert für 130 Aminosäuren (s. Abbildung 15). Im Vergleich mit den bereits bekannten Phosphorylasegenen ist es der cytosolischen Phosphorylasesequenz aus Kartoffel mit 77 % Identität und der cytosolischen Sequenz aus Bohne mit 75 % Identität am ähnlichsten. Mit den plastidischen Sequenzen ist die Identität etwas geringer. So besteht z. B. eine 67 %ige Identität mit der plastidischen Phosphorylasesequenz aus Bohne. *t_aes_cyt* entspricht einem Bereich der Phosphorylasesequenz, der die Bindestelle des Cofaktors Pyridoxalphosphat enthält. Dieser Bereich ist innerhalb der Phosphorylasen hoch konserviert, auch zwischen den plastidischen und cytosolischen Enzymen. Das Fragment konnte also als Sonde zur Identifizierung sowohl cytosolischer als auch plastidischer Phosphorylasesequenzen im Weizen verwendet werden (s. auch IV.4.1).

III.4.2 cDNA-Bank-Herstellung und Isolierung von Phosphorylaseklonen

Zur Herstellung einer cDNA-Bank aus vier Tage alten Weizenblättern wurden 5,8 µg der aus diesen Blättern isolierten polyadenylierten RNA (s. oben) wie unter II.2.3.14.1 beschrieben in cDNA umgeschrieben. Diese wurde einer Größenfraktionierung unterzogen (s. II.2.3.14.2). Die Fraktion mit den längsten cDNA-Fragmenten (Fraktion 6) wurde in den Vektor Uni-ZAP XR ligiert und in Phagenköpfe verpackt (vgl. II.2.3.14.3). Die so gewonnene Bank enthielt 900.000 unabhängige rekombinante Phagen. Der Phagentiter der Bank nach Amplifizierung betrug $1,4 \times 10^9$ pfu/ml. $1,6 \times 10^6$ der amplifizierten Phagen wurden mit dem radioaktiv markierten Phosphorylasefragment *t_aes_cyt* als Sonde wie unter II.2.3.14.5 beschrieben untersucht. Auf den Radioautogrammen waren 28 Hybridisierungssignale zu erkennen. Von diesen bestätigten sich sechs Signale in den anschließenden Hybridisierungsrunden, und deren cDNA wurde isoliert (s. II.2.3.14.4). Eine Ansequenzierung der cDNA zeigte, dass die Sequenzen von drei Klonen (*kI*, *kV* und *kXXI*) homolog zu denen von cytosolischen Phosphorylasen waren. Bei den anderen drei Klonen handelte es sich um ein Fragment mit Homologie zu einer Nukleinsäuresequenz, die für das Reaktionszentrum von Photosystem II codiert (*kXVI*), um ein Fragment mit Homologie zu einem Teil des chloroplastischen Genoms (*kX*) und um eine nicht identifizierbare Nukleotidsequenz (*kII*).

Es konnten keine cDNA-Fragmente mit Homologien zu Genen plastidischer Phosphorylasen in der cDNA-Bank aus Blättern gefunden werden. Daher wurde eine cDNA-Bank aus Endosperm der Weizensorte *Triticum aestivum* L. var. Minaret, die von der Arbeitsgruppe von S. de Pater (Center for Phytotechnology der Universität Leiden, Niederlande) zur Verfügung gestellt wurde, mit der gleichen Sonde *t_aes_cyt* untersucht. Nach der Analyse von ca. 500.000 rekombinanten Phagen dieser cDNA-Bank waren 35 Hybridisierungssignale zu erkennen. Eine Ansequenzierung der

cDNA der sechs bestätigten Signale ergab drei cDNA-Fragmente (*s10*, *s13* und *s14*), die homolog zu Genen bekannter plastidischer Phosphorylasen waren. Ausserdem konnte eine Gammagliadin-Sequenz identifiziert werden (*s8*); zu den weiteren zwei cDNA-Fragmenten konnten keine Homologien gefunden werden (*s6* und *s9*).

III.4.3 Die cytosolische Phosphorylase

Zwei der drei isolierten cDNA-Fragmente der cytosolischen Phosphorylase, *kV* und *kXXI*, sind identisch. Abbildung 16 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz von *kV*. Die Nukleotidsequenz ist 2856 bp lang. Das von Beginn an offene Leseraster codiert bis zum ersten Stoppcodon für 851 Aminosäuren. Vor dem ersten Methionin der Sequenz befinden sich 19 Aminosäuren, aber kein Stoppcodon, welches das Methionin eindeutig als Initiationsstart definieren würde. Das berechnete Molekulargewicht von 93,6 kD des resultierenden Proteins mit 832 Aminosäuren (ab dem ersten Methionin) stimmt mit dem apparenten Molekulargewicht von ca. 92 kD (vgl. III.2.1) gut überein. Der 3'-nicht-translatierte Bereich umfasst 300 bp, 18 davon sind Adenosinreste des PolyA⁺-Schwanzes. Ein mögliches Polyadenylierungssignal (AATAAA) befindet sich 259 Nukleotide stromabwärts des Stoppcodons TGA (PROUDFOOT 1984).

Die cDNA von Klon *kI* stellt ein Fragment der identischen Sequenzen *kV* und *kXXI* dar, beginnend bei deren Nukleotid 1909. Die Sequenz von *kI* ist 1109 bp lang, und ihr 3'-nicht-translatiertes Ende ist um sechs Adenosine kürzer als das der anderen Sequenzen. Es konnten also mehrere übereinstimmende Sequenzen für eine einzige cytosolische Phosphorylase in der cDNA-Bank aus Blättern gefunden werden.

```

1  cgccacctccccgcacacaccgagtgtctgtctgcagcaattccccaccccgcgATGAGTGC GCGGACAAAGGTG
   r h l p r t h r v l v l d a i p h p a M S A A D K V 26
79  AAGCCGCGCGCCAGCCCCGCGTCGGAGGACCCCTCGCCATCGCCGGAACATCTCCTACCACGCGCAGTACAGCCCC
   K P A A S P A S E D P S A I A G N I S Y H A Q Y S P 52
157 CACTTCTCGCCGCTCGCCTTCGGCCCCGAGCAGGCCTTCTACGCCACCGCCGAGAGCGTCCGCGACCACCTCTCCAG
   H F S P L A F G P E Q A F Y A T A E S V R D H L L Q 78
235 AGATGGAACGACACCTACCTGCATTTCACAAAGACGGATCCCAAGCAGACCTACTACCTCTCCATGGAGTACCTGCAG
   R W N D T Y L H F H K T D P K Q T Y Y L S M E Y L Q 104
313 GGCCGCGCGCTCACCAACGCGTCGGCAACCTCGCCATCACC GCGCCTACGCTGACGCCCTGAAGAAGTTCGGCTAC
   G R A L T N A V G N L A I T G A Y A D A L K K F G Y 130
                                     cbrev
391  GAGCTCGAGGCCATCGCTGGACAGGAGAGAGATGCGGCTCTGGGAAATGGTGGCTTGGGCAGGCTTGCATCTTGCTTT
   E L E A I A G Q E R D A A L G N G G L G R L A S C F 156
469  TTGGATTCAATGGCAACGCTGAACCTTCTTGGGGCTATGGCCTTCGTTACCGTTATGGCCTGTTCAAGCAGCGC
   L D S M A T L N L P S W G Y G L R Y R Y G L F K Q R 182
547  ATTGCCAAGGAAGGACAAGAAGAAATCGCTGAAGATTGGCTTGATAAGTTTAGCCCATGGGAGATTGTCAGGCATGAT
   I A K E G Q E E I A E D W L D K F S P W E I V R H D 208
625  GTTGATACCAATCAGATTTTTTCGGCCATGTCGAGATTTCGCCAGATGGAAGCGGAAATGGGCCGGTGGAGAAGTT
   V V Y P I R F F G H V E I S D P D G K R K W A G G E V 234
703  CTGAACGCTTTAGCCTATGATGTGCCAATTCCTGGGTACAAGACAAAAATGCAATCAGTCTTCGCCCTTTGGGATGCA
   L N A L A Y D V P I P G Y K T K N A I S L R L W D A 260
781  ACAGCTACTGCTGAGGATTTCAACTTATTTAGTTCAATGATGGCCAGTATGAGTCAGCTGCTCAACTTCACTCGAGG
   T A T A E D F N L F V E I N D G Q Y E S A A Q L H S R 286
859  GCACAGCAGATATGTGCTGTTCTCTATCCCGTGATGTACAGAAGAAGGGAAGCTTCTGAGATTAAAGCAGCAGTAT
   A Q Q I C A V L Y P G D A T E E G K L L R L K Q Q Y 312

```


Startpunkten der anderen cytosolischen Proteine entfernt. Die Startmethionine der cytosolischen Phosphorylasen aus Reis ist leider nicht bekannt, wobei der N-Terminus der cytosolischen Phosphorylase aus der einzigen anderen monokotylen Pflanze besonders interessant für die Identifikation des Initiations-Methionins aus Weizen wäre.

	1				50
T-aes-cyt	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
O-sat-cyt	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
S-tub-cyt	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
V-fab-cyt	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
A-tha-cyt	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
I-bat-pla	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
S-tub-pla	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
S-ole-pla	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
V-fab-pla	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	51				100
T-aes-cyt	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
O-sat-cyt	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
S-tub-cyt	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
V-fab-cyt	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
A-tha-cyt	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
I-bat-pla	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
S-tub-pla	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
S-ole-pla	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
V-fab-pla	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	101				150
T-aes-cyt	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
O-sat-cyt	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
S-tub-cyt	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
V-fab-cyt	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
A-tha-cyt	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
I-bat-pla	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
S-tub-pla	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
S-ole-pla	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
V-fab-pla	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~

Abbildung 17: Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenzen pflanzlicher Phosphorylasen.

Startaminosäuren der reifen plastidischen Proteine sind mit □, die Startmethionine der cytosolischen Peptide mit ○ gekennzeichnet und fett gedruckt. Es sind nur solche plastidische Sequenzen abgebildet, deren Spaltstelle des Signalpeptids bekannt ist. Die Aminosäuren des Signalpeptids sind kursiv geschrieben und unterstrichen.

- T-aes-cyt = cytosolische Phosphorylase aus *Triticum aestivum*, (AF275551)
- O-sat-cyt = cytosolische Phosphorylase aus *Oryza sativa*, (AF326977)
- S-tub-cyt = cytosolische Phosphorylase aus *Solanum tuberosum*, (M69038)
- V-fab-cyt = cytosolische Phosphorylase aus *Vicia faba*, (Z35117)
- A-tha-cyt = cytosolische Phosphorylase aus *Arabidopsis thaliana*, (AY056807)
- V-fab-pla = plastidische Phosphorylase aus *Vicia faba*, (Z36880)
- I-bat-pla = plastidische Phosphorylase aus *Ipomoea batatas*, (M64362)
- S-ole-pla = plastidische Phosphorylase aus *Spinacia oleracea*, (X85181)
- S-tub-pla = plastidische Phosphorylase aus *Solanum tuberosum*, (Z73684)

Die Zugangsnummern („Accession number“) der Datenbanksequenzen sind in Klammern angegeben.

Als Bestätigung des ersten Methionins (Met 20) als Initiationsstart der cytosolischen Phosphorylase aus Weizen fehlt das stromaufwärts liegende Stoppcodon. Es wurde versucht, dieses mit der Methode RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) zu finden. Anhand der nun bekannten Sequenz der cytosolischen Phosphorylase wurde ein Primer konstruiert („cbrev“, vgl. Tabelle 3 und Abbildung 16), der zur Amplifizierung des 5'-Endes der Sequenz eingesetzt wurde. Hierfür wurde 1 µg Ge-

samt-RNA aus jungen Blättern in cDNA umgeschrieben und am 5'-Ende mit Adaptern versehen (s. II.2.3.11.3). Mit einem Primer, der an diesem Adapter ansetzt, und dem spezifischen Primer *cbrev* wurde versucht, das 5'-Ende zu amplifizieren. Die Produkte dieser PCR wurden in den Vektor pT-Adv kloniert und sequenziert.

Ein amplifiziertes Produkt mit der Größe von etwas über 500 bp (*cb*) entsprach in seiner Sequenz *kV*. Am 5'-Ende beginnt es jedoch 87 bp und damit 29 Aminosäuren vor dem 5'-Ende von *kV*. Wie Abbildung 18 zeigt, konnte in dieser nach vorne verlängerten Sequenz aber auch kein Stoppcodon gefunden werden. Es zeigt sich jedoch auch kein weiteres Methionin als potenzieller Initiationsstart.

CB	1	<u>LIRLTIGQAVVTTQSTRGGSHSVVPRPY</u>	RHLPRTHRVLVLDAIPHPAMS	50
KV	1	RHLPRTHRVLVLDAIPHPAMS	21
CB	51	AADKVKPAASPASEDPSAIAGNISYHAQYSPHFSPLAFGPQAFYATAES		100
KV	22	AADKVKPAASPASEDPSAIAGNISYHAQYSPHFSPLAFGPQAFYATAES		71
CB	101	VRDHLLQRWNDTYLHFHKTDPKQTYYLSMEYLQGRALTNAVGNLAITGAY		150
KV	72	VRDHLLQRWNDTYLHFHKTDPKQTYYLSMEYLQGRALTNAVGNLAITGAY		121

Abbildung 18: Alignment der N-terminalen Sequenz von KV mit der durch RACE gefundenen Sequenz von CB.

Der neu sequenzierte Bereich ist fett gedruckt und unterstrichen.

Da auch nach der Verlängerung des 5'-Endes der Sequenz der cytosolischen Phosphorylase kein Beginn des offenen Leserasters gefunden werden konnte, wurden die vorhandenen Methionine auf ihre Eignung als Startmethionin geprüft. Dies geschah mit einem im Internet zugänglichen Programm (NetStart 1.0, PEDERSEN & NIELSEN 1997), welches die Sequenzumgebung um ein Methionincodon analysiert. Bei der Translation muss hier der Translationskomplex binden können, wofür bestimmte Sequenzmotive notwendig sind. Die Sequenz um das Methionin wird diesbezüglich bewertet und erhält einen Wert zwischen 0,0 und 1,0. Liegt der Wert über 0,5, so ist das Methionin ein potenzieller Translationsstart. Die Sequenz um Methionin 49, das erste Methionin der sequenzierten Sequenz *cb*, erreicht einen recht hohen Wert von 0,853 und ist demnach als Translationsstart geeignet.

III.4.5 Die plastidische Phosphorylase

Von den drei aus der Endosperm-cDNA-Bank isolierten cDNA-Fragmenten, die Homologien zu bekannten plastidischen Phosphorylasen zeigten (vgl. III.4.2), entsprechen zwei (*s10* und *s14*) unterschiedlich langen Fragmenten desselben Transkripts, während das dritte Fragment (*s13*) von einem anderen Transkript abgeleitet ist. *s14* ist 2036 bp lang und in der Sequenz identisch mit dem 2307 bp langen Fragment *s10*. Das offene Leseraster von *s14* codiert bis zum ersten Stoppcodon für 570 Aminosäuren. Diese cDNA besteht aus dem kompletten C-Terminus der plastidischen Phosphorylase, dem Insert und einem Teil des N-Terminus (vgl. I.2). Ähnlich

verhält es sich bei *s10*. Dieser Klon besitzt jedoch eine längere Sequenz des N-Terminus und codiert für 661 Aminosäuren. Der Anfang des N-Terminus und das Transitpeptid für den Transport in den Chloroplasten fehlen beiden Sequenzen. Ihre Enden bestehen aus einem 18 Adenosine umfassenden PolyA⁺-Schwanz. *s13* ist 1239 bp lang und codiert für 431 Aminosäuren. Dieser Sequenz fehlt der N-Terminus völlig, sie beginnt erst am Ende der Insertregion. Darüberhinaus unterscheidet sie sich von den anderen beiden cDNA-Fragmenten durch eine abweichende Sequenz der Insertregion.

[illegible]

Abbildung 19: Vergleich der Aminosäuresequenzen der cytosolischen Phosphorylase KV und der plastidischen Phosphorylase S10.

Übereinstimmende Aminosäuren sind mit • gekennzeichnet. * steht für ein Stoppcodon. Die Insertregion der plastidischen Phosphorylase ist fett gedruckt und unterstrichen. Die Pfeile zeigen die Positionen spezifischer Primer an, die anhand der Sequenzen *kV* und *s10* konstruiert wurden. Das potenzielle Startmethionin der cytosolischen Phosphorylase ist fett gedruckt.

Abbildung 19 zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenz des Klon *s10* mit der Aminosäuresequenz des Klon *kV*. Deutlich ist bei S10 die für die plastidischen

Phosphorylasen typische Insertregion zu erkennen. Die Sequenz von *s10* diene als Vorlage zur Konstruktion spezifischer Primer zum einen für die Insertregion (InsertRev und InsertUni), zum anderen zur Amplifizierung von plastidischen Sequenzen (S10F2 und S10R2) der Weizensorte Star (vgl. Tabelle 3, S. 13). Ebenso wurde die Sequenz von *kV* zur Konstruktion von spezifischen Primern für cytosolische Phosphorylasen genutzt (K5F2 und K5R2).

Die Primer K5F2 und S10F2 sowie K5R2 und S10R2 sind von Sequenzstellen abgeleitet worden, an denen die Aminosäuresequenzen des cytosolischen und des plastidischen Proteins fast vollständig übereinstimmen. Betrachtet man jedoch ihre Nukleotidsequenzen (vgl. Tabelle 3), so sind diese völlig unterschiedlich. Vorversuche mit der cDNA von *kV* und *s10* als Matrize zeigten, dass die Primer für die cytosolische Sequenz, K5F2 und K5R2, tatsächlich nur die cytosolische cDNA zur Amplifizierung von Fragmenten in einer PCR verwenden konnten. Genauso konnten die Primer für die plastidische Sequenz, S10F2 und S10R2, nur die plastidische cDNA als Ausgangsmatrize nutzen.

	1	pbfor	50
pBlatt	LT VAYTNHTV LPEALEKWSL DIMQKLLPRH VEI IETIDEE LMNNIVSKYG		
pKorn	LT VAYTNHTV LPEALEKWSL DIMQKLLPRH VEI IERIDEE LMNTIVSKYG	pkfor1	
cKorn	~~~~TNHTV LPEALEKWSQ AVMRKLLPRH MEI IEEIDKR FREMVIPT..		
	51		100
pBlatt	TADISLLKQK LKDMRILDNV DLPASVAKLF VTKMKKGKL LVESLESIAE		
pKorn	TADISLLKQK LKDMRILDNV DLPASVAKLF IKPKEKKGKL LVESLESIAE		
cKorn	RKD...MEGK IESMRVLDN.	ckfor	
	101	pbrev	150
pBlatt	ADEKTEPEEE ENILSETTEK KGESDSEEAP DAEKEDPEYE LDPFAKYDPQ		
pKorn	ADEKTESEEE ENILSETTEK KGESDSEEAP DAEKEDPEYE LDPFTKYDPQ		
cKornNPE		
	151		200
pBlatt	LPRVVRMANL CVVGGHVSNG VAEIHSEIVK QDVFN SFYEM WPTKFQNKTN		
pKorn	LPRVVRMANL CVVGGHVSNG VVEIHSEIVK QDVFN SFYEM WPTKFQNKTN		
cKorn	KP.VVRMANL CVVAGHTVNG VAEIHSNLIK QELFADYVSI WPNKFQNKTN		
	201		243
pBlatt	GVT PRRWIRF CNPELS~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~	pkrev	
pKorn	GVT PRRWIRF CNPELS~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~		
cKorn	GIT PRRWLRF CNPELSEIVT KWLKTDQWTS NLDLLTGLRK FAD	ckrev	

Abbildung 20: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der durch PCR amplifizierten Fragmente der plastidischen Phosphorylase aus dem Blatt (PBlatt), der plastidischen Phosphorylase aus dem sich entwickelnden Korn (PKorn) und der cytosolischen Phosphorylase aus dem sich entwickelnden Korn (CKorn).

Die Pfeile zeigen die Positionen der in den RACE-Reaktionen verwendeten spezifischen Primer, die anhand der hier abgebildeten Sequenzen konstruiert wurden (vgl. auch Tabelle 3). Das Insert der plastidischen Formen ist fett gedruckt und unterstrichen.

Die spezifischen Primer wurden zur Amplifizierung der plastidischen Phosphorylase der Blätter und Körner und der cytosolischen Phosphorylase der Körner aus der Weizensorte Star verwendet. Ein Fragment der plastidischen Phosphorylase aus den Blättern (*pBlatt*) wurde von in cDNA umgeschriebener PolyA⁺-RNA (s. II.2.3.13) amplifiziert. Für die Amplifizierung der Fragmente der cytosolischen und der plastidischen Phosphorylase aus Körnern (*cKorn* bzw. *pKorn*) wurde Gesamt-RNA von Körnern fünf Tage nach der Blüte in cDNA umgeschrieben und als Matrize verwendet. Die gewonnenen Sequenzen sind in Abbildung 20 dargestellt und dienten als Grundlage für die Konstruktion von RACE-tauglichen Primern.

Zur Klonierung von Phosphorylase-cDNA mittels RACE wurden zunächst aus der Gesamt-RNA von fünf Tage alten Körnern und von sechs Tage alten Blättern zwei verschiedene cDNAs synthetisiert. Die beiden cDNA-Synthesen verwendeten verschiedene Synthesepriemer, die zum einen auf die Eigenheiten des 5'- bzw. des 3'-Endes der mRNAs abgestimmt sind und zum anderen Bindungsstellen für die universellen 5'- und 3'-Primer enthalten (Abbildung 21).

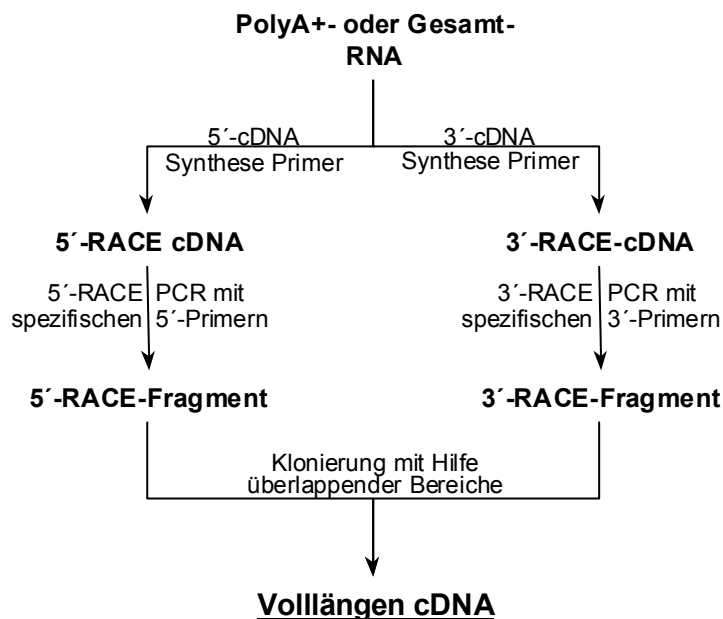


Abbildung 21: Übersicht der Strategie zur Gewinnung von Volllängenklonen durch eine RACE-Reaktion.

Die für die cDNA-Synthese und die PCR-Reaktionen verwendeten Primer sind in Tabelle 3 zu finden. Für die 5'-RACE-cDNA-Synthese wurden zwei Primer verwendet: der SMART II-Primer und der 5'-RACE-cDNA-Synthesepriemer. Das Schema wurde aus dem SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit User Manual (PT3269-1, 23. März 1999) abgewandelt.

Für die nachfolgende RACE PCR-Reaktion wurden geeignete spezifische Primer benötigt. Diese Primer, die länger waren als bei einer herkömmlichen PCR und einen Schmelzpunkt von über 70 °C hatten, wurden anhand der zuvor gewonnenen Genfragmente der verschiedenen Phosphorylasen konstruiert (vgl. Abbildung 20). Für jedes Gen wurden zwei Primer hergestellt, einer für die 5'-RACE-Reaktion und

einer für die 3'-RACE-Reaktion, wobei sich die gebildeten Produkte überlappten. Das überlappende Stück enthielt mehrere Restriktionsschnittstellen, so dass die zwei Amplifikate geschnitten und ligiert werden konnten. Sind die Amplifikate der 5'- und der 3'-Reaktion vollständig, so kann durch diese Methode eine Vollängen-cDNA kloniert werden.

Mit den Primern *pbfor/pbrev*, *pkfor1/pkrev* und *ckfor/ckrev* (Abbildung 20 und Tabelle 3) konnten je zwei unterschiedliche plastidische Fragmente aus dem Blatt und dem Korn und ein cytosolisches Fragment aus dem Korn amplifiziert werden. Die Nukleotidsequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz einer plastidischen Phosphorylase des Kornes wird hier gezeigt (Abbildung 22). Von den anderen Fragmenten zeigt Abbildung 23 eine Übersicht der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der bisher sequenzierten Bereiche; die Sequenzen im Detail und ein Vergleich der Aminosäuresequenzen sind im Anhang zu finden (VIII.2).

Die cDNA-Sequenz der plastidischen Phosphorylase 2 aus Weizenkörnern (*pk2*) ist 2834 Nukleotide lang. Das von Beginn an offene Leseraster codiert für 838 Aminosäuren mit einem resultierenden Molekulargewicht von 94,6 kD. Der 3'-nicht-translatierte Bereich umfasst 320 bp, 19 davon Adenosinreste des PolyA⁺-Schwanzes. In dieser Sequenz sind zwei Polyadenylierungssignale (AATAAA) vorhanden, die sich 226 bzw. 283 Nukleotide nach dem Stoppcodon TGA befinden. 234 Nukleotide und damit 78 Aminosäuren bilden bei dieser plastidischen Phosphorylase den Insertbereich. Ein Vergleich mit anderen plastidischen Sequenzen zeigt, dass am 5'-Ende einschließlich des Transitpeptids noch ca. 500 bp fehlen.

Wie in Abbildung 23 zu sehen, konnten bisher von den Nukleotidsequenzen der plastidischen Phosphorylasen *pb2*, *pb3* oder *pk1* nur Teile des 5'-RACE-Fragments sequenziert werden. Bei allen Sequenzen fehlt noch das Transitpeptid und der Bereich des Initiationscodons. Die Ursache hierfür sind höchstwahrscheinlich Sekundärstrukturen am Beginn der mRNA, die entweder die vollständige Übersetzung in cDNA durch die Reverse Transkriptase oder die Amplifizierung während der PCR-Reaktion stören (CHENCHIK et al. 1996). Von der Sequenz der cytosolischen Phosphorylase aus Körnern (*ck1*) fehlt die Sequenz des kompletten 5'-RACE-Fragments, genauso wie die des 5'-RACE-Fragments der plastidischen Phosphorylase *pb2*, da sie nicht ansequenziert werden konnten. Die 3'-RACE-Fragmente aller Phosphorylasesequenzen sind dagegen bereits vollständig sequenziert.

```

1  CTATCCATGGAATTTTTCAGGGAAGAGCTCTTACAAATGCTATTGGCAACCTAGAGCTAACAGGACAATATGCAGAA
   L S M E F L Q G R A L T N A I G N L E L T G Q Y A E      26
79  GCGTTAAAACAACCTTGGACAGAACCCTAGAGGATGTTGCTAGTCAGGAACCAGATCCTGCCCTTGGCAATGGTGGACTA
   A L K Q L G Q N L E D V A S Q E P D P A L G N G G L      52

```

157	GGCCGCTAGCGTCTCTTTTCTGGATTCTATGGCAACCTAAATATCCAGCATGGGGATATGGACTTCGGTACAGA	
	G R L A S C F L D S M A T L N Y P A W G Y G L R Y R	78
235	TATGGCCTCTTTAAGCAAAATCATAACAAAGGATGGTCAGGAGGAGGTAGCTGAGAATTGGCTAGAGATGGGAAATCCA	
	Y G L F K Q I I T K D G Q E E V A E N W L E M G N P	104
313	TGGGAGATTGTAAGAAATGATGTCTCTTATCTCTGAAATTCATATGGCAAAGTGGTTGAAGGCAC'TGATGGGAGAAAA	
	W E I V R N D V S Y P L K F Y G K V V E G T D G R K	130
391	CAC'TGGATTGGAGGAGAGAATATCAAGGCTGTGGCACATGATGTTCTTATTCCTGGCTACAAGACTAAAACTACTAAT	
	H W I G G E N I K A V A H D V P I P G Y K T K T T N	156
469	AATCTTCGTCTTTGGTCAACAACAGTACCATCACAAAAC'TTTGATTGGGAGCTTTTAATGCTGGGGATCATGTCAAG	
	N L R L W S T T V P S Q N F D L G A F N A G D H V K	182
547	GCCAACGAACACATCTAAATGCTGAAAAGATATGCCAGTTCAGATTCCAGGGGACGAATCAGAGGGGAAAAAT	
	A N E A H L N A E K I C H V L Y P G D E S S E G K I	208
625	CTTCGCCTGAAACAACATATACACTATGCTCGGCCCTCCCTGCAGGACATTATTTCTCGTTTGGAGTCGAGGGCTGGT	
	L R L K Q Q Y T L C S A S L Q D I I S R F E S R A G	234
703	GATCTCTCTCAAGCTGGGAGACTTCCCTCTAAAGTTGCAGTTTCAGATGAATGACACCCATCCAGACATGTGCAATCCC	
	D S L N W E D F P S K V A V Q M N D T H P T L C I P	260
781	GAGTTAATGAGAATACTGATGGATGTTAAGGGATTGAGCTGGAATGAGTCTTGGAGTATCACGGAAGAACCCTTGCA	
	E L M R I L M D V K G L S W N E S W S I T E R T V A	286
859	TACACTGAACACAGTACTTCCCTGAAGCTTGGAGACTTGGACATTATGCAGAAACTTCTACCTGACAT	
	Y T N H T V L P E A L E K W S L D I M Q K L L P R H	312
937	GTTGAGATTATAGAAAGATAGATGAGGAGCTGATGAACACCATCGTCTCAAAATATGGAACGGCAGATATTTCACTG	
	V E I I E R I D E E L M N T I V S K Y G T A D I S L	338
1015	TTAAACAGAACTTAAGATATGAGGATCTTAGACAAGCTTTCAGTCTTCCAGCCTCTGTGCTAAACTGTTTCAATTTAAA	
	L K Q K L K D M R I L D N V D L P A S V A K L F I K	364
1093	CCAAAGAGGAAAAGGGGAAGTTGCTTGTGAATCTTTGGAGTCTATTGCTGAAGCTGACGAGAAAAC'TGAGTCAGAA	
	P K E E K G K L V E S L E S I A E A D E K T E S E	390
1171	CAGGAGGAAAACATTTCTCCGAGACAACAGAGAAAAGGGCGAATCTGACTCTGAAGAAGCTCCTGATGCAGAAAAG	
	E E E N I L S E T T E K K G E S D S E E A P D A E K	416
1249	GAGGATCCTGAGTATGAGTTAGATCCATTTACAAAATACGATCCTCAGTTACCTAGAGTTGTTCCGATGGCAATCTC	
	E D P E Y E L D P F T K Y D P Q L P R V R M A N L	442
1327	TGTGTTGTTGGTGGACATTCAGTTAATGGTGTGGCTGAGATTACACAGTGAAATGTTAAGCAAGATGTGTTCAATAGC	
	C V V G G H S V N G V A E I H S E I V K Q D V F N S	468
1405	TTTTATGAGATGTGGCCTACTAAGTTCCAAAACAAAACAGGAGTAAC'TCCAGGCGTTGGATCCGGTTTTGTAAAT	
	F Y E M W P T K F Q N K T N G V T P R R W I R F C N	494
1483	CCTGAATTAAGTGCAATCATTTTCAAAATGGATAGGCTCTGATGACTGGATTCTGAACACTGGAATCTGCAGACTG	
	P E L S A I I S K W I G S D D W I L N T D K L A G L	520
1561	AAGAAGTTTGTCTGATGATGAGGATCTGCAATCAGAATGGCGTACTGCTAAAAGGAATAACAAGATGAAGGTAGTTTCG	
	K K F A D D E D L Q S E E W R T A K R N N K M K V V S	546
1639	CTGATAAGAGACAAGATGATATGTCAGCCAGATGCGATGTTGATGTGCAGGTGAAAAGAAATACATCAATAT	
	L I R D K T G Y V V S P D A M F D V Q V K R I H E Y	572
1717	AAGCGGCAGCTGCTAAATATCCTTGGTATCGTTTACCGATACAAGAGATGAAAGAAATGAGTGCCAAAAGATAGAATA	
	K R Q L L N I L G I V Y R Y K K M K E M S A K D R I	598
1795	AAGAGCTTTGTTTCCAAGGTATGCATATTTGGTGGGAAAGCTTTTCCACTTACGTACAGGCAAGAGGATTGTGAAG	
	K S F V P R V C I F G G K A F A T Y V Q A K R I V K	624
1873	TTTATCACAGATGTGCGAGCTACTGTAAATATGACCCCTGATGTTGGAGATTACTGAAGGTTGTATTTGTCCCAGAT	
	F I T D V A A T D V N Y D P D V G D L L K V F V P D	650
1951	TATAATGTTAGCGTTGCTGAGAAGCTCATCTGCCAGTGAATTTGCCAGCATATCAGTACCGCTGGAATCGAAGCT	
	Y N V S V A E K L I P A S E L S Q H I S T A G M E A	676
2029	AGTGAACCAACATGAAGTTTTCGAATGAATCGTTGTATTCTTATTGGAAC'TTTGGATGGTGCGAATGTGGAGATC	
	S G T S N M K F A M N S C I L I G T L D G A N V E I	702
2107	AGAGAAGAGGTTGGAGAGGAGAATTTTTCCTCTTTGGTGCACATGCACCTGAAATCGCTGGTTTGAAGGCAAGAGG	
	R E E V G E E N F F L F G A H A P E I A G L R Q E R	728
2185	GCTGAAGGAAAGTTTGTGCTGACCCGAGATTGGAAGAGGTTAAGGAATACGTCCGCAGTGGCGTCTTTGGGACTAGC	
	A E G K F V P D P R F E E V K E Y V R S G V F G T S	754
2263	AACATATGATGAATTGATGGGTTCTTTGGAAGGAAATGAAGGTTATGGACGTGCAGATTATTTCTTGTGTCAGGAT	
	N Y D E L M G S L E G N E G Y G R A D Y F L V G K D	780
2341	TTTCCCAGTTACATTGAATGCCAGCAAAAAGTTGATGAAGCATACCGAGATCAGAAGCTATGGACAGAATGCTATC	
	F P S Y I E C Q Q K V D E A Y R D Q K L W T R M S I	806
2419	CTCAACACAGCGGGTTCCCCCAAGTTCAGCAGTGACCGGACATCCATGAGTACGCCAAGGACATATGGGATATCAGC	
	L N T A G S P K F S S D R T I H E Y A K D I W D I S	832
2497	CCCGTCATCATGCCCTGAataattcaagcagcttcaggaaaccttgagagctctatgaggcgcatgtgctcgcatattt	
	p V I M P * 838	
2575	gcctcgattcagcgagaatgcattgctccccccagttttgtatagggcatatgcaagttctgacatggacactgagtg	
2653	tgagagcatgcagggtagttaatccttagcaatcttgcgtgtcagttggccagttattaccaggcttatggtgtgtgt	
2731	atttcgcgcaataaaggttggagcagaatcatcaaacaaacatacttgggtgtatctgtaatgataaataaattggtaa	
2809	atgactcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 2834	

Abbildung 22: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz der plastidischen Phosphorylase *pk2*.

Die Nukleotide sind links, die Aminosäuren rechts nummeriert. Die Aminosäuren des codierenden Bereichs sind mit Großbuchstaben angegeben, genauso die codierenden Nukleotide. Die Insertregion ist fett gedruckt und unterstrichen. Der Kasten umrahmt das Pyridoxalphosphat-Bindungsmotiv. Der für die Klonierung wichtige, sich überlappende Bereich des 5'- und des 3'-RACE-Fragments ist grau unterlegt. * steht für ein Stoppcodon.

PB2 = **PK1** = **CB**

PB3 = **PK2** = **CK1**

Abbildung 23: Schematische Übersicht der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der bisher sequenzierten Phosphorylase-RACE-Fragmente aus Weizen.

Gezeigt sind die Sequenzen der plastidischen Phosphorylasen aus dem Blatt (PB 2/3) und aus dem Korn (PK 1/2) und der cytosolischen Phosphorylasen aus dem Blatt (CB) und dem Korn (CK1). Das potenzielle Startmethionin und das Stoppcodon von CB sind rot gekennzeichnet.

III.5 AKTIVITÄTS-UND EXPRESSIONSANALYSEN

Neben der Reinigung der Phosphorylaseproteine und der Identifizierung ihrer Nukleotidsequenzen war die Untersuchung der Funktion der Enzyme von großem Interesse. Bis heute ist nicht geklärt, inwieweit die Phosphorylase am Stärkeabbau oder an der Stärkesynthese beteiligt ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, in Blättern allgemein und während der Entwicklung des Blattes und des Korns einen Hinweis auf die mögliche Bedeutung der Phosphorylase zu erhalten. Dafür wurde Phosphorylaseaktivität in jungen und erwachsenen Blättern (III.5.1) und im erwachsenen Blatt während des Tagesverlaufs verfolgt (III.5.2). Im Verlauf der Keimung des Korns wurde eine Situation massiven Abbaus der Reservestärke, verbunden mit der Verarbeitung der Abbauprodukte im Embryo untersucht (III.5.3). Während der Entwicklung des Korns dagegen wurde eine Phase hoher Stärkesynthese betrachtet (III.5.4).

III.5.1 Abhängigkeit der Phosphorylaseaktivität vom Blattalter

Ab dem dritten Tag der Keimung sind die Primärblätter so weit entwickelt, dass sie geerntet und extrahiert werden können. Eine Auftragung der Phosphorylaseaktivität in Abhängigkeit vom Alter der Blätter zeigt, dass die Aktivität in jungen Blättern höher ist als in älteren Blättern (s. Abbildung 24). Die am Anfang sehr hohe Aktivität der Phosphorylase in den Blättern fällt vom fünften Tag nach der Keimung an rapide ab und schwankt um 30 % des anfänglichen Wertes.

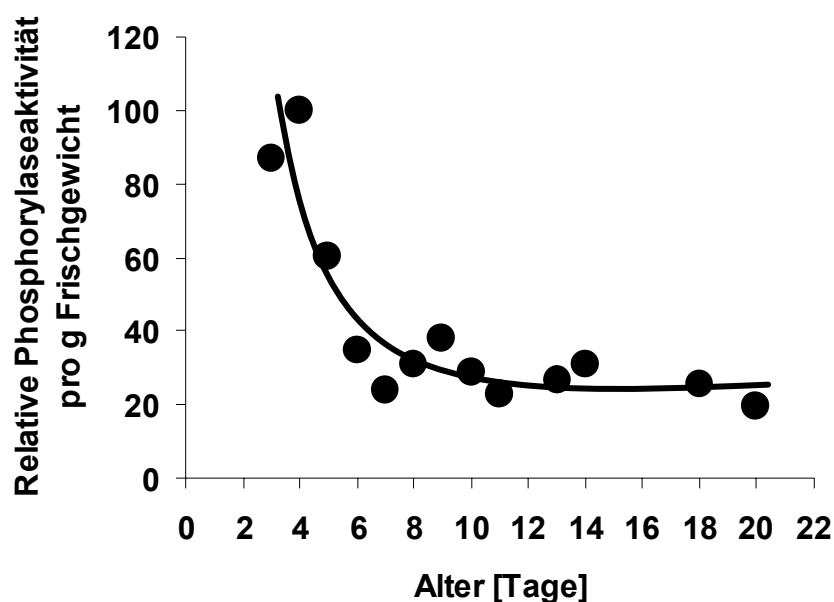


Abbildung 24: Phosphorylaseaktivität der Blätter in Abhängigkeit ihres Alters.

Die Aktivitätsbestimmung von Rohextrakten der Primärblätter erfolgte wie unter II.2.5.2.1 beschrieben. Aufgetragen ist die relative Aktivität, die höchste Aktivität wurde gleich 100 gesetzt.

Der elektrophoretische Aktivitätsnachweis in Rohextrakten der Blätter der ersten 10 Tage zeigte, dass der Aktivitätsverlust hauptsächlich auf einen Rückgang der cytosolischen Phosphorylasen zurückzuführen war (nicht abgebildet). Die plastidische Form blieb über diesen Zeitraum relativ konstant.

III.5.2 Tagesgang der Phosphorylaseaktivität im Blatt

Die während der Photosynthese in den Chloroplasten der Blätter gebildete Stärke wird in der Nacht mobilisiert und abtransportiert. Der Gehalt der Blätter an dieser transitorischen Stärke zeigt demnach einen ausgeprägten Tagesgang. Manche Stärke verarbeitenden Enzyme wie die α -Amylase und das R-Enzym aus Spinat zeigen ebenfalls eine Veränderung ihrer Aktivität im Verlauf der Dunkel- und Hellperioden (BECK et al. 1981). Ein Tagesgang der Phosphorylase konnte auch bei einigen Pflanzen festgestellt werden (PAUL ET AL. 1993, SHATTERS & WEST 1995). Das Verhalten der Phosphorylaseaktivität in voll ausgebildeten Blättern 19 Tage alter Weizenpflanzen wurde untersucht. Es konnte jedoch keine signifikante Änderung der Phosphorylaseaktivität über den Verlauf von 24 Stunden (mit einer Lichtphase von 16 Stunden und einer Dunkelphase von 8 Stunden) beobachtet werden (nicht abgebildet).

III.5.3 Aktivität und Expression der Phosphorylasen während der Keimung

Während der Keimung eines Weizenkorns wird die im Endosperm gespeicherte Stärke mobilisiert. Die Endprodukte Mono- und Dihexosen werden exportiert und den wachsenden Organen zur Verfügung gestellt. In Abbildung 25 ist zu sehen, dass der Abbau der Stärke am dritten Tag nach der Quellung des Korns anfängt. Bis Tag 3 bleibt die Stärkemenge konstant, danach verringert sie sich. Am Tag 2 beginnt jedoch bereits eine langsame Freisetzung von Zuckern, die bis zum fünften Tag exponentiell ansteigt.

Gleichzeitig mit dem verstärkten Abbau der Stärke wird am dritten Tag nach Beginn der Quellung massiv Phosphorylasetranskript gebildet (Abbildung 26 A). Die Expression beginnt schon am zweiten Tag, jedoch nur zu einem sehr geringen Maß; das Maximum wird am vierten Tag erreicht. Diese Transkription von Phosphorylasengen betrifft hauptsächlich die cytosolische Form, da mit der Sonde für die plastidische Form ein wesentlich schwächeres Signal zu erkennen ist (Abbildung 26 B). Die Auftragskontrolle mit der Sonde für die 18S rRNA (Abbildung 26 C) zeigt auch einen Anstieg dieses Transkripts mit fortschreitender Keimung, der aber nicht so extrem ist wie der des Phosphorylasetranskripts. Der Anstieg dieser Kontroll-RNA lässt sich auf die vermehrte Proteinexpression während der Keimung und die hierfür benötigten ribosomalen Komplexe zurückführen. In Kornhälften ohne Embryo ließ sich kein spezifisches Signal und damit keine Expression erkennen, weder des cyto-

solischen noch des plastidischen Phosphorylasetranskripts (Abbildung 26 D bzw. E). Dies lässt darauf schließen, dass die Expression von Phosphorylasegenen ausschließlich im Embryo stattfindet und sich hauptsächlich auf das cytosolische Gen beschränkt.

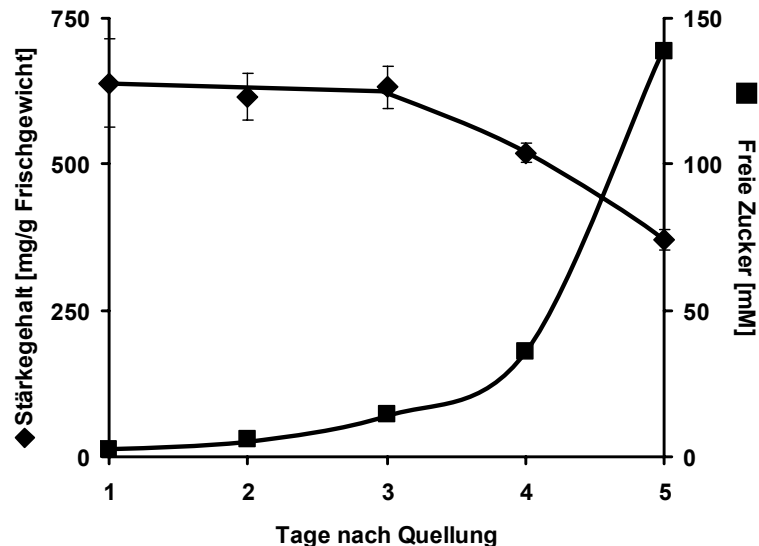


Abbildung 25: Stärkegehalt \blacklozenge und Konzentration der freien Zucker \blacksquare keimenden Weizenkörnern.

Zum Zeitpunkt 1 Tag nach Quellung sind die Körner gequollen. Die Zeitpunkte 2 bis 5 Tage bezeichnen die auf die Quellung folgenden Tage der Keimung. Bestimmung der Stärke und der Zucker wie unter II.2.5.3 beschrieben.

Die Phosphorylaseaktivität von Extrakten keimender Körner stammt nur von den cytosolischen Formen P1 und P2, wie in dem elektrophoretischen Aktivitätsnachweis in Abbildung 26 G zu sehen ist. Im trockenen Korn kommt hauptsächlich P1 vor. Nach der Quellung tritt auch vermehrt P2 auf. Die Aktivität steigt jedoch nicht in dem Maß, wie der Anstieg der Transkriptmenge erwarten lässt. Die Proteinmenge in den Kornextrakten konnte mit Hilfe des Antiserums quantifiziert werden. Dabei zeigt sich, dass Transkript- und Proteinmenge zum gleichen Zeitpunkt ansteigen (Abbildung 26 H). Das Bild des Westernblots zeigt keine so große Steigerung des Phosphorylaseproteins wie des Transkripts vom zweiten auf den dritten Tag, eine Zunahme ist jedoch deutlich zu sehen. Einen Tag zeitversetzt zur Transkriptmenge erreicht das Phosphorylaseprotein am fünften Tag ein Maximum. Die Extrakte der embryofreien Kornhälften zeigten keine Aktivität im Aktivitätsgel und auch keine Reaktion mit dem Antiserum (nicht abgebildet).

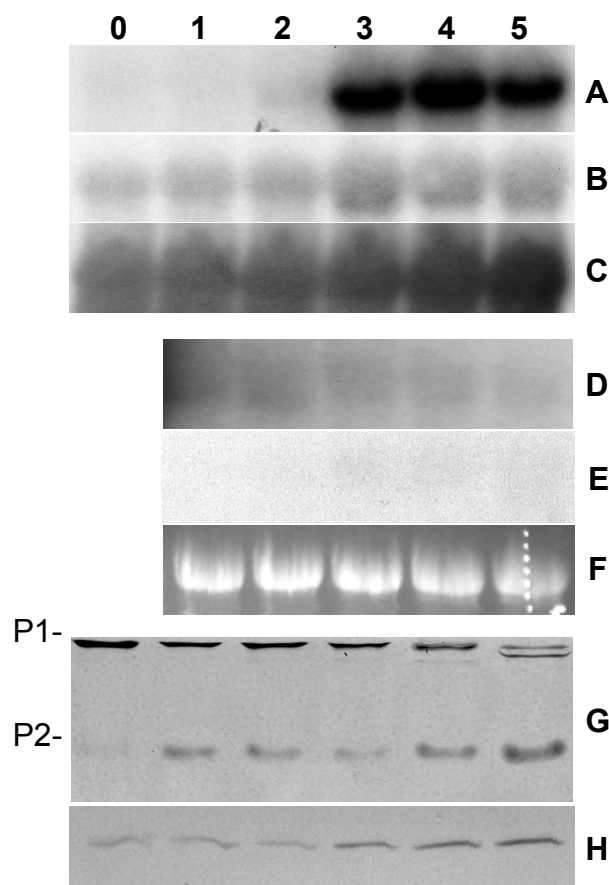


Abbildung 26: Expression von Phosphorylasetranskript und Phosphorylaseaktivität in trockenen, gequollenen und keimenden Weizenkörnern.

A-E sind Radioautogramme von Northernblots mit je 10 µg Gesamt-RNA von gesamten keimenden Körnern (**A**, **B** und **C**) und von embryofreien Kornhälften (**D** und **E**) nach Hybridisierung mit folgenden Sonden: **A** und **D**: *t_aes_cyt*, komplementär zu Sequenzabschnitten aller Phosphorylasen. **B** und **E**: Sonde spezifisch für das Insert der plastidischen Phosphorylasen. **C**: Sonde für Teile der 18S rRNA als Auftragskontrolle für **A** bzw. **B**. **A** wurde 48 Stunden, **B** wurde 72 Stunden, **C** 20 Minuten und **E** und **D** 144 Stunden exponiert. **F**: Auftragskontrolle für **D** bzw. **E**, Ethidiumbromidfärbung des Agarosegels. **G**: Aktivitätsgel mit einpolymerisiertem Glycogen. Auftrennung und Inkubation wie in Abbildung 2 beschrieben. **P1** und **P2** ebenfalls wie in Abbildung 2. **H**: Westernblot mit je 30 µg Protein aus Rohextrakten der gesamten keimenden Körner. Die Verdünnung des Antikörpers gegen Phosphorylase betrug 1:500. Für die Abbildungen **G** und **H** wurden gesamte Körner extrahiert.

Auf die Northernblots und Proteingele wurden RNA bzw. Extrakte von trockenen Körnern (**0**) und von gequollenen Körnern am ersten (**1**) zweiten (**2**), dritten (**3**), vierten (**4**) und fünften Tag der Keimung (**5**) aufgetragen.

III.5.4 Aktivität und Expression der Phosphorylasen während der Kornentwicklung

Die Entwicklung von Weizenkörnern zeichnet sich durch die Synthese von Stärke als Speichermolekül aus. Diese dient als Energiereserve für die spätere Keimung. Die Stärke umfasst nach Abschluss der Entwicklung ca. 60 % des Frischgewichtes der Körner, wie in Abbildung 27 zu sehen ist. Die Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf der Stärkeakkumulation und die in den Körnern messbare Phosphorylaseaktivität. Die Stärke beginnt am neunten Tag nach der Blüte langsam zu akkumulieren. Ab Tag 30 steigt der Stärkegehalt exponentiell an. Die Phosphorylaseaktivität hat ihr

Maximum zu Beginn der Stärkesynthese, um den zehnten Tag. Sie bleibt bis zu Tag 23 noch auf einem relativ hohen Niveau. Die restlichen 20 Tage bis zur Beendigung der Samenentwicklung kann kaum Aktivität nachgewiesen werden.

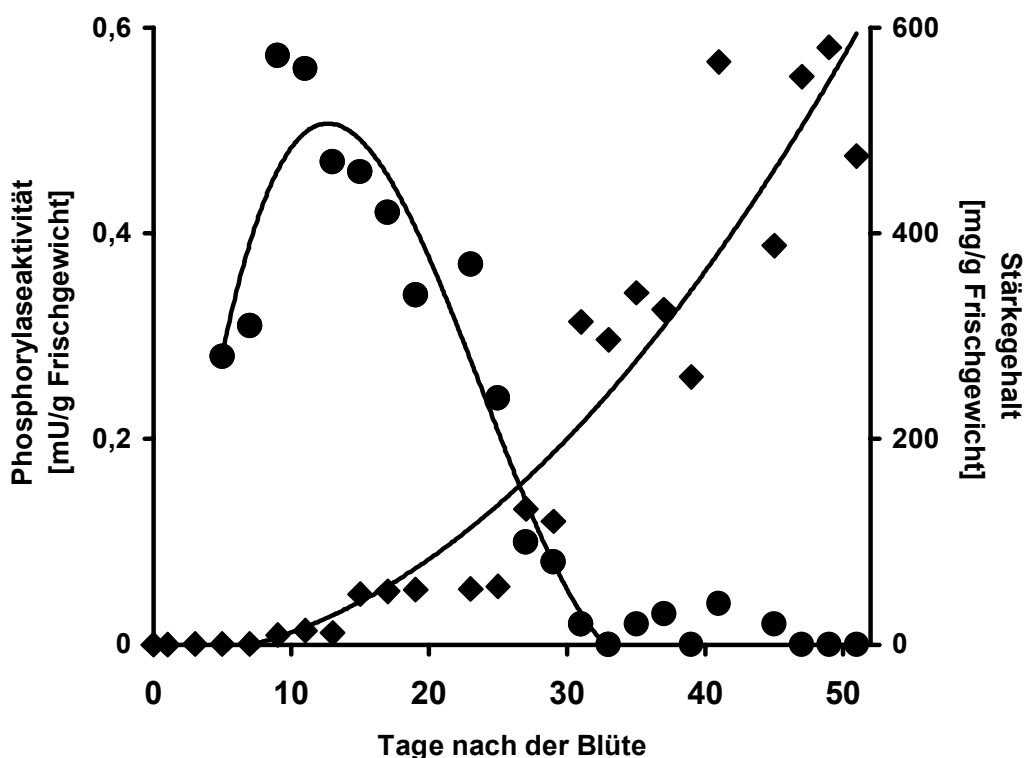


Abbildung 27: Stärkegehalt \blacklozenge und Phosphorylaseaktivität \bullet während der Entwicklung der Körner.

Bestimmung des Stärkegehaltes wie unter II.2.5.3 beschrieben. Nachweis der Phosphorylaseaktivität im gekoppelten optischen Test mit löslicher Stärke als Substrat (II.2.5.2.1). Der Tag 0 bezeichnet den Tag der Blüte, der durch das Exponieren der Antheren charakterisiert ist.

Um die Rolle der Phosphorylase in der Kornentwicklung besser verstehen zu können, wurde die Expression der Transkripte sowohl der Phosphorylasen (Abbildung 28 B und C) als auch der für die Stärkesynthese wichtigen Enzyme ADP-Glucose Pyrophosphorylase (D) und Stärkesynthase II (E) untersucht sowie die Entwicklung der Aktivität der Phosphorylasen (G) verfolgt und das Protein der cytosolischen Phosphorylase immunologisch nachgewiesen (H). Abbildung 28 A zeigt das Aussehen der Weizenkörner während ihrer Entwicklung.

Der elektrophoretische Aktivitätsnachweis, welcher mit den gleichen Proben durchgeführt wurde, deren Aktivität für Abbildung 27 gemessen wurde, zeigt, dass die Hauptaktivität von der plastidischen Phosphorylase geleistet wird (Abbildung 28 G). Durch Untersuchungen von isoliertem Endosperm konnte die Aktivität der plastidischen Phosphorylase im Endosperm nachgewiesen werden, sie tritt demnach nicht

nur im embryohaltigen Teil des Korns auf (nicht abgebildet). Die Intensität der Aktivitätsbanden über die Zeit der Kornentwicklung ist mit dem Verlauf der Aktivitätskurve in Abbildung 27 vergleichbar. Nur während der ersten drei Tage der Kornentwicklung ist auch die cytosolische Phosphorylase P2 nachzuweisen. Die Aktivität von P1 ist in den ersten drei Tagen am höchsten, bleibt bis Tag 33 sehr niedrig und wird dann bis zum Abschluss der Kornentwicklung auf einem höheren Niveau beibehalten. Diese Beobachtung wird durch den immunologischen Nachweis der cytosolischen Phosphorylase bestätigt (Abbildung 28 H). Der Verlauf der Menge an gefärbtem Komplex aus Antigen und Antikörper während der Entwicklung der Körner entspricht dem Verlauf der Intensität der Aktivitätsbanden der cytosolischen Phosphorylase.

Die Expression der Phosphorylasegene wurde mit Northernblots unter Verwendung von zwei verschiedenen DNA-Sonden untersucht. Wurde eine Sonde für alle Phosphorylaseformen (*t_aes_cyt*, vgl. Abbildung 15) verwendet, so ist am Tag der Blüte eine sehr hohe Expression zu erkennen, die an den darauf folgenden Tagen stark abnimmt (Abbildung 28 B). Von Tag 9 bis Tag 33 wird nur eine scheinbare Expression detektiert, die höchstwahrscheinlich auf eine unspezifische Wechselwirkung mit der in dieser Höhe laufenden 28 S ribosomalen RNA wie auch bei den Signalen der Stärkesynthase II (s. auch unten) zurückzuführen ist. Die RNAs der cytosolischen Phosphorylase laufen vor der ribosomalen RNA und werden daher zu den schmalen Signalen komprimiert (BUCHNER et al. 1996), die z.B. an den Tagen 1, 5 und 41 des Northernblots aller Phosphorylaseformen gut zu erkennen sind. Dieses schmale Signal ist zwischen Tag 9 und 33 nicht zu sehen. Ab Tag 35 kann wieder eine leicht verstärkte Expression der Phosphorylasen festgestellt werden. Schwankungen der Expression müssen immer mit der Ethidiumbromid-Auftragskontrolle verglichen werden (Abbildung 28 F). So werden z.B. die scheinbar verstärkten Signale von Tag 23 bis 27 durch eine überhöhte Auftragsmenge verursacht.

Das Expressionsmuster der spezifischen Sonde (Insert-Sonde) für die plastidische Phosphorylase (Abbildung 28 C) zeigt, dass die plastidische Phosphorylase nur während der ersten sieben Tage der Kornentwicklung exprimiert wird. Später ist keine Expression mehr nachzuweisen. Da mit der Sonde für beide Phosphorylaseformen am Tag der Blüte eine sehr hohe Expression detektiert wird, muss diese demnach von der cytosolischen Phosphorylase stammen, genau wie die Expression auf niedrigem Niveau ab Tag 35. Der Verlauf der Expression der plastidischen Phosphorylase stimmt nicht mit dem Verlauf der in denselben Proben beobachteten Phosphorylaseaktivität überein (Abbildung 28 G). Wie oben beschrieben erreicht diese Aktivität ihr Maximum um den zehnten Tag der Entwicklung, zu einem Zeitpunkt, an welchem keine mRNA mehr nachzuweisen war. Die hohe Aktivität bleibt noch ca. 13 Tage nach diesem Zeitpunkt erhalten, wie in Abbildung 28 zu sehen ist.

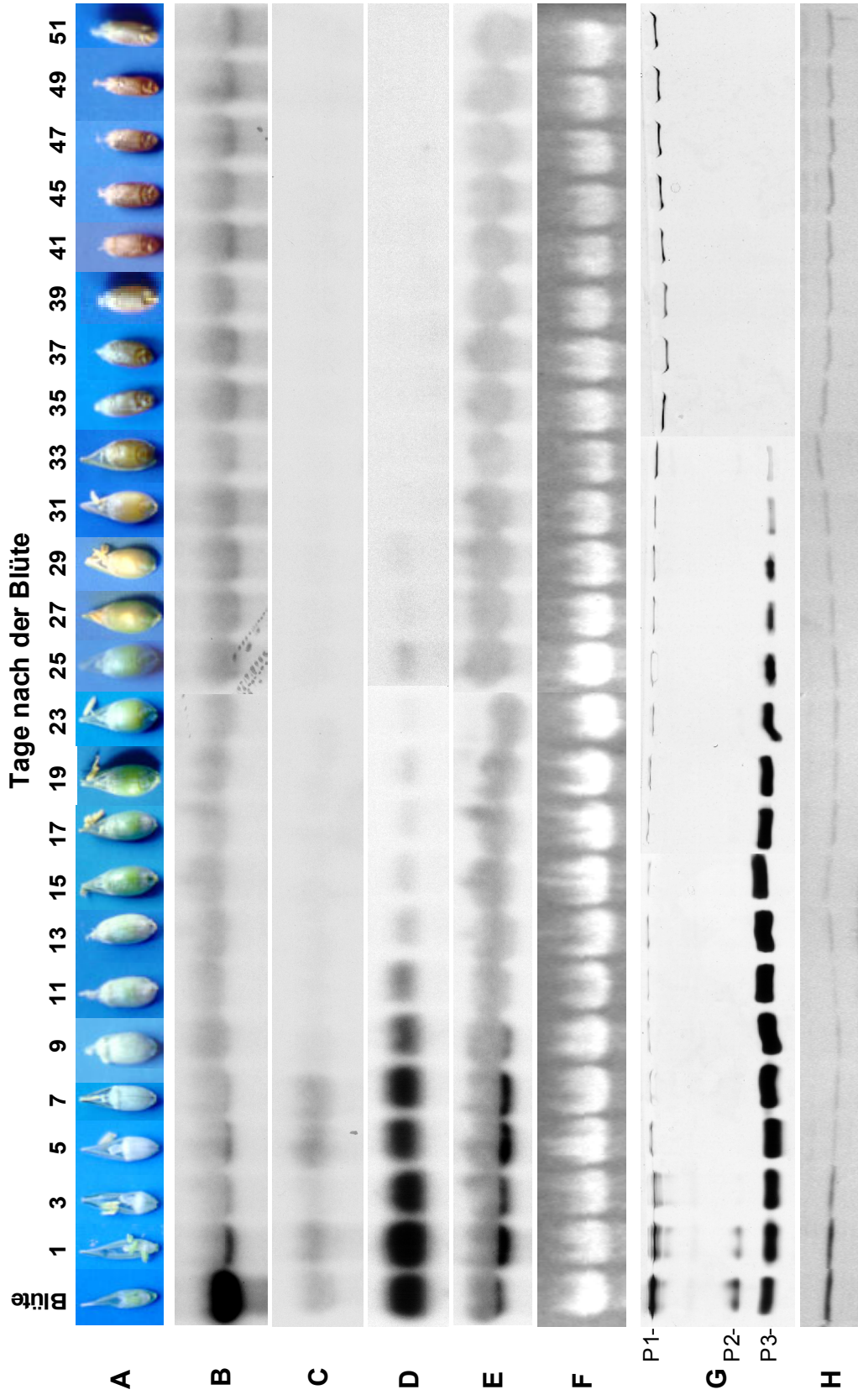


Abbildung 24: Expression von Phosphorylasen und anderen Stärke-metabolisierenden Enzymen während der Kornentwicklung.

A: Fotografien der sich entwickelnden Weizenkörner. **B-E:** Radioautogramme eines Northernblots mit je 10 µg Gesamt-RNA mit folgenden Sonden: **B:** *t_aes_cyt*, die alle Phosphorylasen erkennt. **C:** Insert-Sonde, die spezifisch für plastidische Phosphorylasen ist. **D:** Sonde für die große Untereinheit der AGPase. **E:** Sonde für die Stärkesynthase II. Die Exposition der Radioautogramme betrug je 24 Stunden. **F:** Auftragskontrolle, Ethidiumbromidfärbung des Agarosegels. **G:** Aktivitätsgel mit einpolymerisiertem Glycogen (s. II.2.4.4.1). **H:** Westernblot mit je 30 µg Protein aus Rohextrakten der sich entwickelnden Körner. Die Verdünnung des Antikörpers gegen Phosphorylase betrug 1:500. Bezeichnung der Phosphorylasen: **P1** = cytosolische Phosphorylase 1, **P2** = cytosolische Phosphorylase 2, **P3** = plastidische Phosphorylase.

Die Transkription der Gene von zwei weiteren untersuchten Enzymen, der großen Untereinheit der ADP-Glucose Pyrophosphorylase und der Stärkesynthase II, findet ebenfalls hauptsächlich in den ersten Tagen der Entwicklung der Körner statt. Die große Untereinheit der AGPase wird sehr kräftig bis zum siebten Tag exprimiert, und eine leichte Expression kann noch bis Tag 29 festgestellt werden (Abbildung 28 D). Die Stärkesynthase II wird ebenfalls bis zum siebten Tag stark, nach dem neunten Tag aber nicht mehr exprimiert (Abbildung 28 E). Das weiterhin zu sehende Signal ist, wie oben beschrieben, eine unspezifische Wechselwirkung mit der dort laufenden ribosomalen RNA. Wie bei der plastidischen Phosphorylase erreicht die Expression dieser Enzyme ihr Maximum bereits am ersten Tag nach der Blüte. Die verminderte Expression am dritten Tag, die bei allen Expressionsmustern zu erkennen ist, ist auf einen verminderten RNA-Gehalt dieser Probe zurückzuführen, wie die Kontrolle mit der Ethidiumbromidfärbung des Gels in Abbildung 28 F zeigt.

IV DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden die Proteine und die zugrundeliegenden cDNA-Sequenzen der α -1,4-Glucan-Phosphorylasen aus Weizen (*Triticum aestivum* L.) untersucht. Das cytosolische Protein konnte aus den Blättern mittels Affinitätschromatographie an Cycloheptaamylose-Sepharose gereinigt werden und wurde hinsichtlich einiger physikochemischer Eigenschaften und seiner Substratpräferenzen charakterisiert. Es diente auch zur Herstellung polyklonaler Antikörper, die sich als spezifisch für die cytosolische Phosphorylase erwiesen. Mehrere cDNA-Sequenzen sowohl von cytosolischen als auch von plastidischen Weizen-Phosphorylasen konnten isoliert werden. Sie wurden mit bekannten pflanzlichen Phosphorylasesequenzen verglichen und zur Herstellung spezifischer Sonden für die Detektion von Phosphorylasetranskripten genutzt. Weiterhin wurde die Expression der Phosphorylasen in Blättern der Weizenpflanze und in sich entwickelnden und keimenden Körnern untersucht.

IV.1 REINIGUNG

IV.1.1 Die cytosolische Phosphorylase

Affinitätschromatographie an Cycloheptaamylose-Sepharose ermöglichte die Reinigung der cytosolischen Phosphorylase aus Weizenblättern. Das Endprodukt der Reinigung, das für die weitere Charakterisierung eingesetzt wurde, war ein homogenes Polypeptid von ca. 92 kD, wie in der gelelektrophoretischen Analyse in Abbildung 9 zu sehen. Die cytosolische Phosphorylase aus Weizenblättern ist das einzige dieser Proteine, welches mit einer Affinitätschromatographie an einem Inhibitor und nicht an einem Substrat gereinigt wurde.

Bisher wurden alle cytosolischen Phosphorylasen aus Pflanzen durch Affinitätschromatographie an Stärke-, Glycogen- oder Dextrin-Sepharose meist verbunden mit weiteren Säulenchromatographien gereinigt. So wurde z. B. das cytosolische Enzym aus Erbsenblättern durch eine Kombination von Affinitätschromatographien an Stärke-Sepharose und an Dextrin-Sepharose mit zwei Gelfiltrationen gereinigt (CONRADS et al. 1986). Die cytosolische Phosphorylase aus Weizenblättern band nicht an Affinitätssäulen, die als Ligand ein potenzielles Substrat wie Stärke, Glycogen, Dextrin oder Amylopektin trugen (nicht abgebildet). Andere stärkemetabolisierende Enzyme wie eine α -Amylase aus Weizen und das R-Enzym aus Spinat (WESELAKE & HILL 1982 bzw. LUDWIG et al. 1984) konnten erfolgreich durch Affinitätschromatographie an immobilisierten Cyclodextrinen gereinigt werden. Die Cyclo-

dextrine Cyclohexaamylose, Cycloheptaamylose und Cyclooctaamylose sind als kompetitive Inhibitoren vor allem der plastidischen Phosphorylase bekannt (SHIMOMURA et al. 1982). Für die partiell gereinigten Phosphorylaseformen aus Weizen konnte gezeigt werden, dass hier im Gegensatz zu anderen Pflanzen das cytosolische Enzym durch Cycloheptaamylose stärker gehemmt wird als das plastidische (SCHUPP 1997). Bei einer Affinitätschromatographie an Cycloheptaamylose-Sepharose banden die Phosphorylaseformen P1 und P2 vollständig an diese Säule und konnten mit dem Inhibitor in Lösung wieder eluiert werden (vgl. Abbildung 2). Die plastidische Phosphorylase P3 passierte die Säule ohne zu binden.

Die Elutionsfraktionen einer kleinvolumigen Cycloheptaamylose-Sepharosesäule mit Phosphorylaseaktivität enthielten nur zwei Polypeptide mit Molekulargewichten um 90 kD und 100 kD, wobei zunächst in zwei Fraktionen das kleinere Polypeptid alleine von der Säule eluierte, in den folgenden Fraktionen begleitet von dem größeren Polypeptid (nicht abgebildet). Die beiden Polypeptide werden zur Vereinfachung im weiteren 90 kD- und 100 kD-Protein genannt. Eine Spreizung der beschriebenen Elution wurde durch den Einsatz einer Cycloheptaamylose-Sepharosesäule mit grossem Volumen erreicht. Über deren Säulenbett bildete sich ein Gradient des Elutionsmittels aus und das 90 kD-Protein eluierte über eine größere Anzahl von Fraktionen alleine, bevor das 100 kD-Protein bei höheren Cycloheptaamylose-Konzentrationen ebenfalls von der Säule abgelöst wurde (Abbildung 4 B). Die beiden Proteine haben anscheinend eine unterschiedlich hohe Affinität zu Cycloheptaamylose. Die Affinität des 90 kD-Proteins zu Cycloheptaamylose ist geringer als die des 100 kD-Proteins. In den Fraktionen, die das kleinere Protein alleine enthielten, war der Hauptteil der Aktivität der Phosphorylaseformen P1 und P2 vertreten. Dieses Protein ist demnach mit Sicherheit eine cytosolische Phosphorylase. Die Fraktionen, die scheinbar nur das größere Protein enthielten, zeigten eine sehr geringe P1-Aktivität, die aber auch durch Spuren auf dem Gel nicht nachweisbaren 90 kD-Proteins verursacht worden sein könnte (Abbildung 4 A). Es war nicht klar, ob dieses Protein keine Phosphorylaseaktivität besaß oder die Aktivität durch die Reinigung verloren hatte.

Versuche zur Trennung des 90 kD- und des 100 kD-Proteins zeigten, dass sie eine ähnliche Nettoladung besaßen und ähnliche pI-Formen während isoelektrischer Fokussierung bildeten (III.1.1.2). Dies ließ auf eine Verwandtschaft der beiden Proteine schließen, obwohl die pI-Formen des 100 kD-Proteins, im Gegensatz zu denen des 90 kD-Proteins, keine Phosphorylaseaktivität zeigten (Abbildung 5). Aufgrund seiner höheren Affinität zu Cycloheptaamylose konnte das 100 kD-Protein von dem 90 kD-Protein durch Rechromatographie an Cycloheptaamylose-Sepharose getrennt werden. Nach der Elution von dieser zweiten Säule konnte wiederum keine Aktivität in den Fraktionen, die das 100 kD-Protein enthielten, nachgewiesen werden

(Abbildung 7). Da es seine mögliche Phosphorylaseaktivität aber schon bei der ersten Chromatographie verloren hatte, überraschte dies nicht.

Nachdem es nicht möglich war, eine Phosphorylaseaktivität bei dem 100 kD-Protein nachzuweisen, sollten die Aminosäuresequenz dieses Proteins und die des 90 kD-Proteins verglichen werden. Dabei stellte sich heraus, dass beide Proteine N-Terminal blockiert sind und damit für den Edman-Abbau unzugänglich. Dies ist bei vielen tierischen Phosphorylasen der Fall und wurde auch bei der cytosolischen Phosphorylase aus Kartoffel festgestellt (SCHILTZ et al. 1980 bzw. MORI et al. 1991). Nachdem keine Informationen über den N-Terminus zugänglich waren, wurden die Spaltmuster des 90 kD- und des 100 kD-Proteins nach enzymatischer und chemischer Spaltung verglichen. Es wurden drei verschiedene Spaltagenzien eingesetzt, um ein möglichst eindeutiges Ergebnis zu erhalten: die Protease Trypsin, welche nach Arginin und Lysin spaltet, BNPS-Skatol, welches nach Tryptophan spaltet und NTCB, welches vor Cystein spaltet. Bei der Spaltung des 90 kD- und des 100 kD-Proteins mit Trypsin entstanden sehr viele Banden (Abbildung 8 A). In der von der cDNA-Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz der aus einer cDNA-Bank isolierten cytosolischen Phosphorylase kommt Lysin 61 mal und Arginin 43 mal vor (vgl. Abbildung 16). Diese Häufigkeit der Aminosäuren, nach denen Trypsin spaltet, erklärt die Vielfalt der Spaltpeptide. Neben einigen unterschiedlichen Spaltpeptiden sind im Trypsin-Spaltmuster viele übereinstimmende Peptide des 90 kD- und des 100 kD-Proteins zu erkennen. Anhand dieses Spaltmusters ließ sich keine eindeutige Aussage über die Ähnlichkeit der beiden Proteine treffen. Eine Spaltung mit BNPS-Skatol erschien vielversprechender, da die Aminosäure Tryptophan in den Sequenzen anderer cytosolischer Phosphorylasen nur 17-19 mal vorkommt. In der Sequenz der cytosolischen Weizenphosphorylase kommen tatsächlich auch nur 17 Tryptophane vor (Abbildung 16). Die Spaltmuster des 90 kD- und des 100 kD-Proteins nach Spaltung mit BNPS-Skatol bestanden demnach aus wesentlich weniger Peptiden als die der Trypsinspaltung (Abbildung 8 B). Ein Teil der Spaltprodukte beider Proteine hatte eine ähnliche Masse, aber es gab auch viele unterschiedlich schwere Peptide. Nach dieser Spaltung deutet sich bereits an, dass sich die cytosolische Phosphorylase und das 100 kD-Protein nicht sehr ähnlich sind. Diese Annahme wurde durch einen Vergleich der Spaltmuster nach Spaltung mit NTCB bestätigt. Die Peptide, die entstanden, als das 90 kD- und das 100 kD-Protein vor den wenigen in den Proteinen vorhandenen Cysteinen gespalten wurden (in der Sequenz der cytosolischen Phosphorylase kommen sieben Cysteine vor, Abbildung 16), waren vollkommen unterschiedlicher Masse (Abbildung 8 C und Tabelle 10). Diese Spaltung zeigte, dass die beiden Proteine nicht verwandt sind, das 100 kD-Protein also mit hoher Wahrscheinlichkeit keine Phosphorylase ist.

Darüberhinaus konnte mit der NTCB-Spaltung unterstrichen werden, dass das 90 kD-Protein eine cytosolische Phosphorylase ist. Denn die mit Hilfe des Gels in Abbildung 8 berechneten Massen der Peptide stimmen gut mit den anhand der cDNA-Sequenz der cytosolischen Phosphorylase berechneten Massen von Peptiden zwischen zwei Cysteinen überein (Abbildung 16 und Tabelle 10). Somit konnte das aus Blättern isolierte Protein der aus Blatt-RNA isolierten Gensequenz zugeordnet werden. Ein weiterer Hinweis, dass es sich bei dem 90 kD-Protein um eine cytosolische Phosphorylase handelt, ergab sich aus dem Vergleich des BNPS-Skatol-Spaltmusters mit dem Spaltmuster der cytosolischen Phosphorylase aus Erbse nach Spaltung mit N-Chlorsuccinimid. N-Chlorsuccinimid spaltet wie BNPS-Skatol nach Tryptophan. Die Spaltmuster sind sich sehr ähnlich, denn 10 von 16 Haupt-Spaltpeptiden des 90 kD-Proteins aus Weizen stimmten mit 10 von 15 Haupt-Spaltpeptiden der cytosolischen Phosphorylase aus Erbse überein (CONRADs et al. 1986). Nur drei der Spaltpeptide des 100 kD-Proteins sind denen der Erbse ähnlich. Dies ist ein weiteres Argument gegen die Zugehörigkeit des 100 kD-Proteins zu den Phosphorylasen.

Den endgültigen Beweis, ob es sich bei dem 100 kD-Protein um eine Phosphorylase handelt oder nicht, sollte die N-terminale Ansequenzierung der Spaltstücke erbringen. Die tryptischen Peptide lagen für eine akkurate Analyse zu dicht aneinander. Die Durchführung der Methode mit den Spaltstücken der BNPS-Skatol-Spaltung wurde bisher durch die ungenaue Auftrennung der Peptide in dem verwendeten Gelsystem nach SCHÄGGER & VON JAGOW (1987) verhindert. In Abbildung 8 ist zu erkennen, dass die Peptidbanden der BNPS-Spaltung im Vergleich zu den Banden der anderen Spaltungen nicht so scharf liefen. Dies trat bei jeder Auftrennung der BNPS-Spaltstücke auf, auch nachdem die Polymerisierungszeit des Gels und die Laufdauer der Elektrophorese verlängert wurden. Dies war ungewöhnlich, da dieses Gelsystem speziell zur Auftrennung von kleineren Peptiden entwickelt und an anderer Stelle in der Arbeitsgruppe erfolgreich verwendet worden war (ZEMANOVÁ et al. 2002). Die Spaltstücke der NTCB-Spaltung sind durch die Spaltreaktion N-terminal blockiert (Wu et al. 1996) und daher für den Edman-Abbau ungeeignet. Die Ansequenzierung konnte nicht durchgeführt werden. Es empfiehlt sich eine andere Methode, wie z. B. eine massenspektrometrische Analyse der Spaltstücke des 90 kD- und 100 kD-Proteins zur Identifizierung der Proteine zu testen.

Aufgrund der Peptidspaltmuster und der fehlenden Phosphorylaseaktivität wurde angenommen, dass es sich bei dem 100 kD-Protein um ein Protein mit anderer Funktion handelt. Daher kann das 90 kD-Protein von nun an als cytosolische Phosphorylase bezeichnet werden und wird nach einer Konvention der „Commission on plant gene nomenclature“ (1994) als **Pho2**-Isoenzym-Typ definiert. Es blieb jedoch unklar, weshalb sich das 100 kD-Protein so schwer von der cytosolischen

Phosphorylase trennen ließ. Eine Ursache hierfür können seine Eigenschaften sein, da es eine der cytosolischen Phosphorylase vergleichbare Nettoladung besitzt, ähnliche pI-Formen bildet und an Cycloheptaamylose bindet. Eine weitere Begründung wäre aber auch, dass es sich bei dem 100 kD-Protein um einen Modulator der Phosphorylase handelt, der an die Phosphorylase bindet. Diese Theorie konnte jedoch nach Überprüfung des Einflusses des 100 kD-Proteins auf die Aktivität der cytosolischen Phosphorylase verworfen werden. Die Phosphorylase wird durch das 100 kD-Protein weder aktiviert noch inhibiert (s. III.2.5).

Es gelang, die cytosolische Phosphorylase durch eine nachgeschaltete zweite Cycloheptaamylose-Sepharosesäule von dem 100 kD-Protein zu trennen. Dieser zweite Reinigungsschritt, bei dem nur ein Teil der Phosphorylase an die Säule band und der andere Teil bereits im Filtrat zu finden war, brachte jedoch so hohe Verluste mit sich, dass er für die präparative Reinigung nicht geeignet war (vgl. Abbildung 7 und Tabelle 11). Zur präparativen Reinigung der cytosolischen Phosphorylase wurden also die Fraktionen der Cycloheptaamylose-Sepharosesäule verwendet, die nach gelelektrophoretischer Analyse nur das Protein mit einer Molekularmasse von ca. 92 kD enthielten. Dies war auch mit einem Verlust an Phosphorylase verbunden, da die Fraktionen, die neben dem 92 kD-Protein das 100 kD-Protein enthielten verworfen wurden. Da sich der Hauptteil des Phosphorylaseproteins und der Phosphorylaseaktivität jedoch in den ersten Fraktionen ohne 100 kD-Protein befand, wie in Abbildung 4 zu sehen, war dieser Verlust vertretbar.

Im Vergleich zu bisher gereinigten Phosphorylasen, wurde bei der Reinigung der cytosolischen Phosphorylase aus Weizenblättern mit über 7000-fach der höchste Anreicherungsfaktor erzielt (Tabelle 11). Die tatsächliche Anreicherung ist wahrscheinlich noch etwas höher, da im Rohextrakt zusammen mit der Aktivität der cytosolischen Phosphorylase auch die der plastidischen Phosphorylase gemessen wurde (s. u.). Die Anreicherungsfaktoren anderer cytosolischer Phosphorylasen bewegen sich um Werte zwischen 659-fach (Maisblätter, MATEYKA & SCHNARRENBURGER 1988) und 3109-fach (Spinatblätter, PREISS et al. 1980). Die spezifische Aktivität des gereinigten Weizenzyms mit 57 U/mg Protein liegt im oberen Bereich der spezifischen Aktivitäten cytosolischer Phosphorylasen, die zwischen 0,29 U/mg Protein (Pappelphosphorylase, WITT & SAUTER 1995a) und 50 U/mg Protein schwanken (Spinatphosphorylase, SHIMOMURA et al. 1982). Die Aktivität des Weizenzyms liegt aber noch 13-fach unter der desjenigen aus Spinatblättern, welches mit 653 U/mg Protein die höchste spezifische Aktivität unter den cytosolischen Phosphorylasen hat, die jedoch in der Syntheserichtung gemessen wurde (PREISS et al 1980). Bei vielen Phosphorylasen, wie auch der Spinatphosphorylase ist die spezifische Aktivität in der Synthese höher als in der Phosphorolyse (s. IV.2.2). Die am Tag der Reinigung gemessene spezifische Aktivität der cytosolischen Phosphorylase aus Weizenblättern

erwies sich jedoch nicht als sehr stabil. Sie sank nach 24 Stunden Lagerung bei 4 °C auf ca. die Hälfte ab. Diese verringerte spezifische Aktivität blieb dann über mehrere Tage mit geringerem Verlust erhalten. Dieser anfängliche Aktivitätsverlust erklärt die Diskrepanz zwischen spezifischer Aktivität nach Reinigung und den während der Charakterisierung erhaltenen Werten (vgl. Tabelle 11 und Tabelle 12).

Die erreichte Ausbeute bei der Aufreinigung der cytosolischen Phosphorylase aus Weizenblättern liegt mit 32 % im Durchschnitt der aufgereinigten cytosolischen Phosphorylasen. Die Ausbeuten reichen von 20 % bei der Reinigung des Proteins aus Erbsenblättern (CONRADS et al 1986) bis zu 43 % bei der Reinigung der cytosolischen Phosphorylase aus Spinatblättern (SHIMOMURA et al. 1982). Beachtet man, dass die anfänglich gemessene Phosphorylaseaktivität eines Rohextraktes auch die Aktivität der plastidischen Phosphorylase beinhaltet, so ist die Ausbeute an cytosolischer Phosphorylase am Ende der Aufreinigung an sich größer als die berechnete Ausbeute. STEUP nimmt ein Verhältnis von 3:1 der cytosolischen zur plastidischen Phosphorylase in Spinatblättern an und berechnet so aus einer ursprünglichen Ausbeute von 40 % eine von der plastidischen Aktivität bereinigte Ausbeute von 70 % (STEUP et al. 1980). So dramatisch dürfte sich die Höhe der Ausbeute bei der Reinigung der cytosolischen Phosphorylase aus Weizen nicht ändern. Anhand des gelelektrophoretischen Aktivitätsnachweises lässt sich einschätzen, dass die cytosolische Aktivität nicht mehr als die Hälfte der Gesamtaktivität in Blättern ausmacht (vgl. Abbildung 2). Für die während der Aufreinigung bestimmten Phosphorylaseaktivitäten wurde jedoch als Substrat Amylopektin verwendet, mit welchem die plastidische Phosphorylase eine geringe Aktivität hat. Dies bedeutet, dass der Hauptteil der in den Aufreinigungsfractionen gemessenen Aktivität von der cytosolischen Phosphorylase stammt und somit die Höhe der Ausbeute und der Anreicherung ungefähr den tatsächlichen Gegebenheiten entsprechen dürfte.

IV.1.2 Die plastidische Phosphorylase

Die chloroplastische Phosphorylase aus Weizenblättern band nur an zwei der getesteten Affinitätsmatrizes, zum einen an Amylopektin und zum anderen an Amylose-Resin jeweils im Batch-Verfahren. Mit der Phosphorylase banden jedoch noch so viele andere Proteine, dass keine Anreicherung eines Proteins mit der typischen Größe einer plastidischen Phosphorylase über 100 kD (STEUP 1988) festgestellt werden konnte. Die chloroplastische Phosphorylase aus Weizenblättern unterscheidet sich durch ihr Unvermögen an Stärke zu binden von anderen gereinigten plastidischen Phosphorylasen. Manche plastidischen Phosphorylasen, wie die aus Spinatblättern oder die aus Maisblättern konnten nach einer Anionenaustauschchromatographie direkt über eine Stärke-Sepharosesäule gereinigt werden (STEUP 1981 bzw. MATEYKA & SCHNARRENBURGER 1988). Bei anderen bildete eine Stärkeadsorption

oder eine Stärke-Sepharosesäule einen der vielen Schritte während der Aufreinigung (plastidische Phosphorylase aus Maisamyloplasten, MU et al. 2001, oder plastidische Phosphorylase aus Bananenblättern, KUMAR & SANWAL 1982). Weitere plastidische Phosphorylasen konnten aber auch durch Anionenaustauschchromatographie verbunden mit Gelfiltrationen gereinigt werden (z.B. aus Maiskörnern, BURR & NELSON 1975 oder aus Yamknollen, HAMDAN & DIPOH 1991).

Eine Anreicherung eines Proteins um 105 kD aus Weizenblättern, verbunden mit plastidischer Phosphorylaseaktivität in denselben Fraktionen, konnte durch eine Kombination von Anionenaustauschchromatographie und hydrophober Interaktionschromatographie erreicht werden (s. Abbildung 10). Die Fraktionen mit dem angereicherten 105 kD-Protein enthielten noch sehr viele andere Proteine, so dass weitere Reinigungsschritte nötig gewesen wären, wie z.B. eine Gelfiltration zur Abtrennung der kleineren Proteinverunreinigungen. Nach der hydrophoben Interaktionschromatographie hatte die chloroplastische Phosphorylase jedoch einen Großteil ihrer Aktivität verloren. Dies machte eine weitere Aufreinigung unmöglich. Die Reinigung der plastidischen Phosphorylasen aus Pflanzen ist nicht einfach, denn die meisten konnten nur mit sehr geringen Ausbeuten zwischen 1,8 % und 6 % gereinigt werden, was unter anderem daran liegt, dass das plastidische Enzym instabiler ist als das cytosolische (SHIMOMURA et al. 1982 bzw. MATEYKA & SCHNARRENBURGER 1988).

Um doch noch gereinigte chloroplastische Phosphorylase aus Weizen zu erhalten, könnte die identifizierte cDNA-Sequenz einer der chloroplastischen Phosphorylasen (*pb2* oder *pb3* in Abbildung 23) in *E. coli* überexprimiert und das isolierte Protein zur Herstellung von Antikörpern verwendet werden. Die gewonnenen Antikörper könnten in einer Immunaффinitätschromatographie getestet werden, wie sie z. B. für die Reinigung der β -Amylase aus Weizen entwickelt wurde (ZEMANOVÁ et al. 2002). Eine weitere Möglichkeit wäre, das amyloplastische Protein aus Endosperm zu reinigen, wie es für die plastidische Phosphorylase aus Maisendosperm beschrieben wurde (MU et al. 2001). Vorversuche mit Weizen var. Star haben gezeigt, dass im Endosperm sich entwickelnder Weizenkörner eine große Menge an höchstwahrscheinlich plastidischer Phosphorylase vorkommt, die sich erst nach mehrmaligem Waschen von den im Endosperm enthaltenen Stärkekörnern trennt (nicht abgebildet). Dies deutet darauf hin, dass die in der Reinigungsprozedur der plastidischen Phosphorylase aus Maisendosperm enthaltene Stärkeadsorption (MU et al. 2001) mit der amyloplastischen Phosphorylase aus Weizenendosperm Erfolg haben könnte.

IV.2 CHARAKTERISIERUNG DER GEREINIGTEN CYTOSOLISCHEN PHOSPHORYLASE

IV.2.1 Charakterisierung des Proteins

Die durch Affinitätschromatographie an Cycloheptaamylose-Sepharose gereinigte Phosphorylase bestand nach denaturierender Elektrophorese aus einer Polypeptidbande (Abbildung 9). Je nach verwendeten Markerproteinen konnte das apparente Molekulargewicht dieses Proteins mit 88,9 kD, 91,5 kD oder 94,4 kD angegeben werden. Das anhand der Gensequenz berechnete Molekulargewicht beträgt 93,6 kD (s. III.4.3). Somit stimmt das Molekulargewicht der cytosolischen Weizenphosphorylase gut mit dem anderer cytosolischer Phosphorylasen überein, deren Molekulargewichte sich zwischen 84,0 kD und 95,9 kD bewegen (aus Spinatblättern, CONRADS et al. 1986 bzw. aus Keimblättern der Saubohne, BUCHNER et al. 1996). Sie ist eindeutig leichter als die bisher auf ihr Molekulargewicht hin untersuchten plastidischen Phosphorylasen, die zwischen 103,9 kD und 115 kD schwer sind (aus Kartoffelknollen, NAKANO & FUKUI 1986 bzw. aus Bananenfrüchten, RICHARDSON & MATHESON 1977). Eine Bestimmung des Oligomerisierungsgrads der nativen Weizenphosphorylase ist noch durchzuführen, um festzustellen, ob sie wie die meisten Phosphorylasen als Homodimer vorliegt (STEUP 1988). Selten werden Tetramere (in Bündelscheidenzellen von Mais, MATEYKA & SCHNARRENBURGER 1988 oder in Filamenten von *Cuscuta reflexa*, SRIVASTAVA et al. 1995) oder Heterodimere gefunden (in der Kartoffel, ALBRECHT et al. 1998)

Während der isoelektrischen Fokussierung bildete dieses eine Polypeptid der cytosolischen Phosphorylase aus Weizenblättern drei verschiedene Banden mit pI-Werten von 5,95, 5,88 und 5,75. Diese pI-Werte liegen nahe an dem pI-Wert 6,1 der einzigen pI-Form der cytosolischen Phosphorylase aus Fingerhirse (*Digitaria eriantha*, SHATTERS & WEST 1996). Multiple pI-Formen, wie sie bei der Phosphorylase des Weizenblatts beobachtet wurden, wurden sonst nur bei der plastidischen Phosphorylase aus älteren Kartoffelknollen gefunden. Diese zwei Formen haben pI-Werte von 5,0 und 5,3 (SCHNEIDER et al. 1981). Mehrere pI-Formen kommen bei Stärke-metabolisierende Enzymen oft vor, wie z. B. bei der β -Amylase oder dem R-Enzym (ZIEGLER et al. 1997 bzw. HENKER et al. 1998)

Im nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel wird nach geeigneter Inkubation eine von der cytosolischen Phosphorylase gebildete Stärkebande sichtbar (SCHUPP 1997). In einem solchen Gel ist ihr Laufverhalten von dem der plastidischen Phosphorylase nicht zu unterscheiden. Wird jedoch Glycogen in das Gel einpolymerisiert, so bleibt ein Teil der cytosolischen Phosphorylase schon bei geringsten Glycogenmengen von ca. 0,01 % am oberen Rand des Gels (Abbildung 29, P1), während der andere Teil genauso wie in einem Gel ohne Glycogen wandert (P2). Diese zwei cytosolischen

Formen konnten nicht nur bei *Triticum aestivum* L. var. Star beobachtet werden, sondern auch bei zwei anderen Sommerweizensorten var. Perdix und var. Fasan, darüber hinaus bei Hartweizen (*Triticum durum* Desf.), Einkorn (*Triticum monococcum* L.) und bei *Triticum boeoticum* (nicht abgebildet). P2 zeigt somit ein ähnliches Laufverhalten wie eine plastidische Phosphorylase, sie wandert allerdings etwas weniger weit. P1 hat also eine hohe Affinität zu Glycogen, während P2 und die plastidische Phosphorylase zu Glycogen keine Affinität haben. Dies bedeutet, dass die cytosolische Phosphorylase, obwohl nur aus einem Polypeptid bestehend, zwei verschiedene Affinitäten zu Glycogen im Gel zeigt. Worin könnte die Ursache für dieses Phänomen liegen?

Es gibt zwei Unterschiede in der Struktur der cytosolischen und der plastidischen Phosphorylase, die für die Diskriminierung von Glycogen durch letzteres Enzym verantwortlich gemacht werden können (MORI et al. 1993). Dies ist zum einen das für plastidische Phosphorylasen typische 70 bis 90 Aminosäuren lange Insert, welches ein sterisches Hindernis für die Bindung langer verzweigter Glucane darstellt (MORI et al. 1993). Zum anderen besitzen cytosolische Phosphorylasen neben dem aktiven Zentrum, wie es auch die plastidischen Enzyme haben, eine zweite Bindungsstelle für Glucane. Diese zeigt Ähnlichkeit zur „glycogen storage site“ der tierischen Glycogenphosphorylasen, die eine höhere Affinität zu Glucanen als das aktive Zentrum selbst aufweist (SHIMOMURA & FUKUI 1980). Bei der plastidischen Phosphorylase aus Kartoffel wurde das Insert gegen die korrespondierende Sequenz der cytosolischen Phosphorylase einschließlich der „glycogen storage site“ ausgetauscht, wodurch sich die Affinität des chimären Proteins zu Glycogen gegenüber der ursprünglichen Phosphorylase mehr als 400-fach steigerte (MORI et al. 1993).

Es scheint, als ob P2 in ihrer Struktur einer plastidischen Phosphorylase ähnlich ist, entweder durch sterische Blockierung des aktiven Zentrums oder der „glycogen storage site“. Dies könnte durch die irreversible Bindung von durch die Extraktion solubilisierten Glucanen oder Inhibitoren an die „glycogen storage site“ eines Teils des Proteins geschehen sein, von denen das Enzym *in vivo* kompartimentiert wäre. Für das aktive Zentrum kann die Bindung eines Glucans ausgeschlossen werden, da dessen Aktivität noch vorhanden ist und im Gel nachgewiesen werden kann. Zur Ausbildung von Homo- und Heterodimeren, die ein unterschiedliches Laufverhalten in Glycogen-haltigen Gelen aufweisen, kommt es bei den zwei plastidischen Phosphorylasen aus Kartoffelblättern (ALBRECHT et al. 1998). Da es in Blättern mindestens zwei Gene für cytosolische Phosphorylasen gibt (s. IV.4.1), von denen bisher nur eines vollständig sequenziert ist und von denen noch nicht bekannt ist, ob sie in den gleichen Zellen exprimiert werden, könnte es vielleicht zu Dimerbildung kommen, bei der ebenfalls die Bindung an Glycogen sterisch verhindert wird. Es ist allerdings wahrscheinlich, dass sich die zwei cytosolischen Weizenphosphorylasen in

ihrer Sequenz ähnlicher sind, als die plastidischen Kartoffelphosphorylasen, bei denen sich vor allem die Insertsequenzen deutlich unterscheiden (SONNEWALD et al. 1995).

In früheren Versuchen war es mit der partiell gereinigten cytosolischen Phosphorylase mit Hilfe einer Anionenaustauschchromatographie an einem Tentakelaustauscher gelungen, die Formen P1 und P2 fast vollständig zu trennen (SCHUPP 1997). Für diese Trennung musste eine unterschiedliche Nettoladung vorliegen. Mit dem gereinigten Enzym konnte die Trennung nicht wiederholt werden. Demnach ging der Ladungsunterschied der beiden Aktivitätsformen durch die Reinigung verloren, was jedoch keine Auswirkung auf ihre Aktivität hatte. Eine endgültige Klärung der Ursache für das Auftreten von zwei Aktivitätsbanden der cytosolischen Phosphorylase im Gel steht noch aus.

IV.2.2 Charakterisierung der Aktivität der cytosolischen Phosphorylase

Substratpräferenzen

Die cytosolische Phosphorylase aus Weizenblättern bevorzugt sowohl in der phosphorolytischen als auch in der synthetisierenden Reaktionsrichtung große verzweigte Glucane gegenüber unverzweigten Glucanen als Substrate, wobei sie die höchste Affinität zu Amylopektin zeigt, gefolgt von Glycogen und löslicher Stärke (vgl. Tabelle 12). Fast alle cytosolischen Phosphorylasen haben eine höhere Affinität zu Amylopektin als zu Glycogen (MORI et al. 1993; SHIMOMURA et al. 1982; PREISS et al. 1980). Die einzige weitere cytosolische Phosphorylase, für die ebenfalls alle diese Substrate Amylopektin, Glycogen und Stärke (keine Präzisierung der Sorte und Löslichkeit) getestet wurden, diejenige aus Maisblättern, bevorzugt Stärke gegenüber Glycogen und dieses gegenüber Amylopektin (MATEYKA & SCHNARRENBARGER 1988). Sie ist aber damit die einzige cytosolische Phosphorylase, die eine höhere Affinität zu Glycogen als zu Amylopektin besitzt und daher möglicherweise keine typische cytosolische Phosphorylase. Das kleinste Glucan, das von der Weizenphosphorylase als Substrat verwendet werden kann, ist, wie bei anderen Phosphorylasen auch, in der Syntheserichtung Maltotetraose und in der abbauenden Richtung Maltopentaose (STEUP & SCHÄCHTELE 1981; NAKAMURA & IMAMURA 1983; MU et al. 2001).

In Tabelle 13 sind die für die cytosolische Weizenphosphorylase ermittelten K_M -Werte in der Phosphorolyse und der Synthese Literaturwerten gegenüber gestellt. Mit Ausnahme des höchsten K_M -Wertes für Maltoheptaose wurden alle Affinitätskonstanten in anderen Arbeiten in der phosphorolytischen Reaktionsrichtung gemessen, so dass vorrangig diese verglichen werden. Die für das cytosolische Weizenenzym ermittelten K_M -Werte liegen meist in der Spannbreite der mit anderen cytosolischen Phosphorylasen gemessenen Werte. Die meisten dieser Enzyme zeigen die gleiche

Substratpräferenz wie das Weizenenzym und haben somit die höchste Affinität zu Amylopektin und die niedrigste zu Maltooligosacchariden. Dies entspricht auch den von STEUP 1988 beschriebenen typischen Eigenschaften einer cytosolischen Phosphorylase. Die Weizenphosphorylase zeigt im Vergleich zu den anderen Enzymen oft einen K_M -Wert, der im oberen Bereich der ermittelten Werte liegt. Sie hat demnach eine wesentlich geringere Affinität zu Amylopektin und Glycogen als z. B. das Enzym aus Kartoffel (MORI et al. 1993). Auffällig ist auch die ebenfalls im Vergleich zu dem Kartoffelenzym geringe Affinität zu Maltoheptaose in der synthetisierenden Reaktionsrichtung. Der in der Phosphorolyse ermittelte K_M -Wert ist dagegen mit einem Wert aus der Literatur vergleichbar (SHIMOMURA et al. 1982). Das einzige Substrat, zu dem die Weizenphosphorylase eine höhere Affinität hat als alle analysierten cytosolischen Phosphorylasen, ist Glucose-1-Phosphat. Ihr K_M -Wert beträgt diesem Fall nur ein Viertel, die Affinität ist also viermal so hoch.

Tabelle 13: Vergleich der K_M -Werte der cytosolischen Weizenphosphorylase in der Phosphorolyse und der synthetisierenden Reaktion mit K_M -Werten anderer cytosolischer Phosphorylasen.

Angegeben sind jeweils die niedrigsten und die höchsten K_M -Werte aus der Literatur. Die Zahl in Klammern verweist auf die Literaturstelle, die im folgenden angegeben wird: (1) = Kartoffelenzym, MORI et al. 1993, (2) = Maisenzym, MATEYKA & SCHNARRENBARGER 1988, (3) = Spinatenzym, PREISS et al. 1980, (4) = Mistelenzym, KHANNA 1971, (5) = Spinatenzym, SHIMOMURA et al. 1982, (6) = Erbsenenzym, MATHESON & RICHARDSON 1978. Alle Literaturwerte in der der phosphorolytischen Reaktion gemessen, mit Ausnahme des höchsten K_M -Wertes für Maltoheptaose, welcher in der Syntheserichtung bestimmt wurde.

Substrat	K_M -Wert Weizenphosphorylase Phosphorolyse/ Synthese [mg/ml]	Niedrigster K_M -Wert [mg/ml]	Höchster K_M -Wert [mg/ml]
Amylopektin	0,029/ 0,03	0,0036 (1)	0,026 (2)
Glycogen	0,04 / 0,07	0,0098 (1)	0,064 (3)
Stärke, löslich	0,15 / 0,1	0,0065 (2)	0,25 (4)
Amylose	0,71 / 3,01	0,17 (3)	-
Maltoheptaose	0,81 / 4,49	0,78 (5)	1,3 (1)
Substrat	K_M -Wert Weizenphosphorylase [mM]	Niedrigster K_M -Wert [mM]	Höchster K_M -Wert [mM]
Phosphat (Phosphorolyse)	2,1 mM	0,9 (3)	6,9 (5)
Glucose-1-Phosphat (Synthese)	0,72 mM	4,0 (6)	6,2 (5)

Für ein weiteres getestetes Substrat, die Maltotetraose, das kleinste in der Syntheserichtung verwendbare Substrat, wurde in der Literatur kein K_M -Wert für eine cytosolische Phosphorylase beschrieben. Es konnte nur eine Affinitätskonstante für eine plastidische Phosphorylase aus Maisendosperm gefunden werden, die mit 0,37 mg/ml nahe an dem Wert von 0,44 mg/ml der Weizenphosphorylase liegt (Mu et al. 2001). Dieser K_M -Wert entspricht nicht den Erwartungen für die cytosolische

Phosphorylase, deren K_M -Werte bis zur Maltoheptaose kontinuierlich von großen, verzweigten Glucanen zu kleinen, unverzweigten Glucanen gestiegen sind. Der K_M -Wert für die kürzere Maltotetraose ist jedoch zehnmal niedriger als derjenige für Maltoheptaose (vgl. Tabelle 12). Es scheint, als ob Maltotetraose als kleinstes Substrat der Synthese diese beschleunigen würde. Allerdings konnte eine Inhibition der cytosolischen Weizenphosphorylase bei Erhöhung der Konzentration über 1 mg/ml festgestellt werden. Dies wurde bereits für die plastidischen Enzyme beschrieben, die schon bei einer Konzentration von 1,3 mg/ml Maltotetraose 70 bis 87 % ihrer Aktivität einbüßten, während die cytosolischen Enzyme in ihrer Aktivität fast unverändert blieben (STEUP & SCHÄCHTELE 1981). Die cytosolische Weizenphosphorylase wurde nicht so effektiv gehemmt wie die plastidischen Enzyme, besitzt aber bei einer Konzentration von 5 mg/ml Maltotetraose nur noch 50 % ihrer Aktivität. Der Effekt dieser Inhibition für die plastidischen Phosphorylasen könnte eine Koordinierung des phosphorolytischen und amylolytischen Glucanabbaus im Chloroplasten sein (STEUP & SCHÄCHTELE 1981). Dass der Inhibition der cytosolischen Phosphorylase eine physiologische Relevanz zugeordnet werden kann, ist unwahrscheinlich, da die für eine Inhibition benötigte Maltotetraosekonzentration sehr hoch ist.

Da die cytosolische Phosphorylase eine Präferenz für große, stark verzweigte Glucane zeigt (Tabelle 12), sollte auch das von YANG & STEUP 1990 aus Spinatblättern und aus Keimblättern der Erbse isolierte cytosolische lösliche Heteropolyglucan ein gutes Substrat für sie darstellen. Die cytosolischen Enzyme aus Spinat und Erbse zeigten eine hohe Affinität zu diesem Glucan und konnten es sowohl als Primer für die Synthese als auch in der abbauenden Reaktion verwenden. Dieses Glucan ist bisher der einzige Hinweis auf ein im Cytosol befindliches großes, stark verzweigtes Glucan, welches als Substrat für die cytosolische Phosphorylase fungieren könnte.

Die Umsatzraten der cytosolischen Phosphorylase in der Phosphorolyse sind 4- bis 7fach niedriger als die in der Stärkesynthese gemessenen. Erhöhte Reaktionsgeschwindigkeiten in der Synthesereaktion gegenüber der Abbaureaktion wurden bei vielen Phosphorylasen ermittelt, wobei die Synthesemaxima zwischen 1,5fach und 9fach höher sind als die Phosphorolysemaxima (plastidische Erbsenphosphorylase: KRUGER & AP REES 1983, bzw. F_2 -Phosphorylase aus Yam (*Dioscorea alata*): OLUOHA & UGOCHUKWU 1995). Unter den Phosphorylasen, auf die dies zutrifft, befinden sich neben cytosolischen Enzymen, wie dem aus Kartoffel mit 2,7fach und dem aus Spinat mit 6fach höherer Syntheseaktivität, auch das Enzym aus Kaninchenmuskel mit 2fach bis 4fach höherer Syntheseaktivität je nach Substrat (MORI et al. 1993, bzw. PREISS et al. 1980, bzw. MOSI & WITHERS 1999). Wenn man von einzelnen Berichten absieht, in denen in der Phosphorolyse eine 1,3fach höhere Aktivität als in der Synthese gemessen wurde (MU et al. 2001), scheint die höhere Syntheseaktivität ein

Merkmal der Phosphorylasen zu sein. Eine Ausnahme bildet das mit Stärke als Substrat in der Syntheserichtung ermittelte Umsatzmaximum der Weizenphosphorylase. Dieses ist als einziges ähnlich hoch wie der korrespondierende Wert in der Phosphorolyse.

Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert und von Thiolen

In der phosphorolytischen Reaktionsrichtung ist die cytosolische Phosphorylase aus Weizenblättern zwischen pH 5,0 und 9,0 aktiv. Das Maximum der Aktivität liegt bei pH 7,0. Bei pH 6,0 und 8,0 sind noch ca. 50 % der Aktivität vorhanden (Abbildung 12 A). Ähnlich verhält es sich bei dem cytosolischen Enzym aus Maisblättern, dessen Optimum um pH 7,0 etwas breiter ist, das bedeutet 50 % der Aktivität sind noch bei pH 5,5 und 8,5 vorhanden (MATEYKA & SCHNARRENBURGER 1988). Es gibt allerdings auch cytosolische Enzyme, deren Aktivitätsmaxima bei niedrigeren pH-Werten liegen, wie z. B. das aus Fingerhirse, welches sein pH-Optimum zwischen pH 5,0 und 6,0 hat. (SHATTERS & WEST 1996). In der synthetisierenden Reaktionsrichtung ist die Weizenphosphorylase ebenfalls zwischen pH 5,0 und 9,0 aktiv (Abbildung 12 B). Das Aktivitätsmaximum ist jedoch um eine pH-Einheit ins Saure verschoben und liegt bei pH 6,0. Der Bereich erhöhter Aktivität ist breiter als in der Phosphorolyse, denn 50 % der Aktivität sind noch bei pH 4,5 und 7,5 vorhanden. Eine Verschiebung des pH-Optimums der Synthesereaktion zu niedrigeren pH-Werten im Vergleich zur Abbaureaktion konnte auch anderweitig beobachtet werden. Das Optimum der Phosphorolyse des cytosolischen Spinatenzym z. B. liegt um pH 6,5 und das der Synthese um pH 6,0 (SHIMOMURA et al. 1982). Bei der Phosphorylase aus *Chlorella* liegt wie bei Weizen in der Phosphorolyse das Optimum um pH 7,0, in der Synthese um pH 6,0 (NAKAMURA & IMAMURA 1983). Bei einem physiologischen pH-Wert zwischen 7,0 und 7,5 (OJA et al. 1999) im Cytosol ist anzunehmen, dass aufgrund der breiten pH-Optima beide Reaktionen der Weizenphosphorylase stattfinden können, vorausgesetzt die entsprechenden Substrate stehen zur Verfügung.

Im Gegensatz zu anderen Enzymen des Stärkemetabolismus, wie z. B. den Pululanasen (HENKER et al. 1998), wird die cytosolische Phosphorylase aus Weizenblättern durch reduzierende Agenzien nicht aktiviert. Thiole wie DTT, β -Mercaptoethanol oder reduziertes Glutathion bis zu einer Konzentration von 5 mM beeinflussten die Aktivität der Phosphorylase nicht. Dies ist bei den einzigen in dieser Hinsicht getesteten Phosphorylasen aus Bananenfrüchten ebenso (SINGH & SANWAL 1976).

IV.3 ANTIKÖRPER

Gegen die cytosolische Phosphorylase wurden polyklonalen Antikörper hergestellt. Dies geschah zu einem Zeitpunkt, an dem es noch nicht möglich war, große Mengen der cytosolischen Phosphorylase ohne Verunreinigung durch das 100 kD Protein zu reinigen (s. III.1.1.1). Der zunächst durchgeführte Versuch, ein Kaninchen mit aus einem SDS-Gel ausgeschnittener cytosolischer Phosphorylase zu immunisieren, schlug fehl. Das denaturierte Phosphorylaseprotein aus Weizen hatte anscheinend eine geringe Antigenizität in Kaninchen, was schon bei dem denaturierten β -Amylaseprotein aus Weizen festgestellt wurde, welches ebenfalls keine Immunantwort hervorrufen konnte (WAGNER 1999). Daher wurde ein weiteres Kaninchen mit dem nativen 90 kD- zusammen mit dem 100 kD-Protein in Lösung immunisiert, wobei in der Probe ca. 70 % 90 kD- und 30 % 100 kD-Protein enthalten war. Obwohl unvermeidlicherweise auch das 100 kD-Protein als Antigen eingesetzt wurde, erwies sich das gebildete Antiserum als sehr spezifisch für das gewünschte Protein mit ca. 92 kD. Mit diesem Protein, welches die cytosolische Phosphorylase darstellt (IV.1.1), zeigte es eine starke Reaktion, reagierte aber nicht mit dem 100 kD-Protein (s. Abbildung 13). Eine Überprüfung der Spezifität des Antiserums mit Rohextraktproteinen in Westernblot-Analysen zeigte, dass es in hohen Konzentrationen (1:250) mit mehreren Proteinen des Rohextraktes reagierte (Abbildung 14). Die meisten fremden Banden waren schon bei der Verminderung der Antiserumkonzentration von 1:250 auf 1:500 nicht mehr zu erkennen. Es steht somit mit einer Verdünnung von 1:750 ein Antiserum zur Verfügung, welches spezifisch die cytosolische Phosphorylase erkennt.

Eine geringe Kreuzreaktivität mit einem Protein im Rohextrakt von ca. 100 kD konnte bei der höchsten Antikörperkonzentration von 1:250 beobachtet werden (Abbildung 14 A, weißer Pfeil). Dabei könnte es sich zum einen um das 100 kD-Protein oder zum anderen um die plastidische Phosphorylase handeln, da letztere in dieser Größenordnung erwartet wurde (STEUP 1988). Kreuzreaktivitäten zwischen Antikörpern gegen cytosolische Phosphorylasen und dem plastidischen Enzym oder umgekehrt wurden nur bei hohen Antikörperkonzentrationen beobachtet (CONRADS 1986, SCHÄCHTELE & STEUP 1986). Dies liegt daran, dass beide Proteine völlig unterschiedliche Epitope zur Antikörperbindung besitzen, wie durch Epitop-Kartierung herausgefunden wurde (STEUP & SCHÄCHTELE 1986). Bei diesen Untersuchungen wurde ebenfalls festgestellt, dass Antikörper gegen cytosolische Phosphorylasen eine breitere Kreuzreaktivität zwischen Phosphorylasen verschiedener Spezies aufweisen. So reagiert das Antiserum gegen Weizenphosphorylase mit der in den Markerproteinen enthaltenen Phosphorylase b aus Kaninchenmuskel, ebenso wie das Serum gegen die cytosolische Phosphorylase aus Spinat und das gegen die Phosphorylase aus der Rotalge *Gracilaria* (STEUP & SCHÄCHTELE 1986 bzw. YU et al. 1993).

Das erhaltene Antiserum gegen cytosolische Phosphorylase ist für eine semi-quantitative Analyse von cytosolischer Phosphorylase in Rohextrakten mit Hilfe von Westernblots gut geeignet. In Zukunft soll getestet werden, ob das Antiserum für die immunhistochemische Lokalisierung der cytosolischen Phosphorylase und als immobilisierter Ligand für die Immunaффinitätschromatographie verwendet werden kann.

IV.4 ISOLIERUNG VON cDNAs VON PHOSPHORYLASEGENEN

Mit revers transkribierter polyadenylierter RNA aus vier Tage alten Weizenblättern als Matrize konnte mit Hilfe von degenerierten Primern ein cDNA-Fragment (*t_aes_cyt*) amplifiziert werden, das für Sequenzen sowohl der cytosolischen als auch der plastidischen Phosphorylasen repräsentativ ist (III.4.1, Abbildung 15). Die Sequenz von *t_aes_cyt* umfasst das in Phosphorylasegenen hoch konservierte Pyridoxalphosphat-Bindemotiv (HUDSON et al. 1993) und konnte daher als Sonde für beide Phosphorylaseformen verwendet werden. Ein Sequenzvergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz *T_aes_cyt* mit den aus Weizen schließlich gewonnenen Phosphorylasesequenzen zeigt eine sehr starke Ähnlichkeit von 94 % bzw. 98 % Identität mit den cytosolischen Phosphorylasen und eine etwas geringere Ähnlichkeit von 69 % identischen Aminosäuren mit den vier plastidischen Sequenzen.

Die Identifizierung der Sequenzen als Phosphorylasesequenzen erfolgte über das Motiv der Pyridoxalphosphat-Bindungsstelle. Deren Konsensussequenz lautet:

E-A-[SC]-G-x-[GS]-x-M-K-x(2)-[LM]-N

Die in eckigen Klammern gesetzten Aminosäuren kommen alternativ vor und das **x** steht für eine beliebige Aminosäure (FUKUI et al. 1982). Das Pyridoxalphosphat ist an das Lysin (K) gebunden. Die Pyridoxalphosphat-Bindungsstelle aller bisher sequenzierten Weizenphosphorylasen hat die Sequenz

E-A-[S]-G-t-[S]-n-M-K-f-a/s-[L/M]-N

und entspricht somit völlig der Konsensussequenz (s. Abbildung 38).

IV.4.1 cDNAs cytosolischer Phosphorylasen

Mit der Sonde *t_aes_cyt* konnten aus einer cDNA-Bank vier Tage alter Weizenblätter drei Phosphorylase-cDNAs mit identischer Sequenz isoliert werden (*kI*, *kV* und *kXXI*, s. III.4.3). Mit aller Wahrscheinlichkeit sind diese cDNAs Transkripte eines einzigen Gens.

Sequenzvergleiche zeigten, dass die cDNA *kV* aus Weizen für eine cytosolische Phosphorylase codiert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz KV ist zu 70 % bis 75 % identisch mit Aminosäuresequenzen von cytosolischen Phosphorylasen aus dikotylen Pflanzen wie z. B. aus der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) oder aus Kar-

toffel (*Solanum tuberosum*). Eine wesentlich stärkere Ähnlichkeit von 85 % Identität zeigt sie gegenüber der cytosolischen Phosphorylase aus der monokotylen Pflanze Reis (*Oryza sativa*). Ähnliche Identitätswerte zu Sequenzen monokotyler Pflanzen von 85 % konnten auch für die Sequenz der Stärkekorn-gebundenen Stärkesynthase aus Weizen gefunden werden, während die Ähnlichkeiten zu Sequenzen aus dikotylen Pflanzen ebenfalls niedriger lagen und zwar unter 71 % Identität (MURAI et al. 1999). Die Ähnlichkeit der Weizenphosphorylase zu plastidischen Phosphorylasen liegt etwas niedriger zwischen 58 % (Reis, *Oryza sativa*) und 61 % Identität (Kartoffel, *Solanum tuberosum*). Die Datenbankzugangsnummern der hier genannten Sequenzen sind in Abbildung 17 zu finden, die der plastidischen Phosphorylase aus Reis lautet AF327055.

Das Methionin 49 der cDNA-Sequenz „cb“, die durch Verlängerung der cDNA-Sequenz *kV* in 5'-Richtung in einer RACE-Reaktion erhalten wurde, stellt mit hoher Wahrscheinlichkeit den Initiationsstart dar. Auch in der Verlängerung der Sequenz konnte kein Stoppcodon vor diesem ersten Methionin gefunden werden (Abbildung 16 und Abbildung 18). Methionin 49 liegt jedoch sehr nahe an den N-Termini der bisher sequenzierten cytosolischen Phosphorylasen und auch nahe bei dem Beginn der reifen plastidischen Phosphorylasen nach Abspaltung ihrer Transitpeptide (Abbildung 17). Außerdem eignet sich die Nukleotidsequenz um dieses Methionin als Translationsstart, was durch das Computerprogramm NetStart 1.0 überprüft wurde (PEDERSEN & NIELSEN 1997). Darüber hinaus wäre das berechnete Gewicht des resultierenden Proteins von mindestens 99 kD mit einem weiter stromaufwärts liegenden Methionin als Initiationscodon größer als das des gereinigten cytosolischen Proteins von ca. 92 kD, und zu groß für eine typische cytosolische Phosphorylase (STEUP 1988).

Höchstwahrscheinlich liegt die Phosphorylasesequenz *cb* dem über eine Cycloheptaamylose-Sepharosesäule isolierten cytosolischen Protein zugrunde (III.1.1). Die Spaltstücke des cytosolischen Proteins nach BNPS- und nach NTCB-Spaltung konnten der Sequenz *cb* gut zugeordnet werden (vgl. III.1.1.3 und Tabelle 10). Trotzdem sollte in Zukunft noch ein Vergleich der Nukleotidsequenz mit N-terminalen Sequenzen von Peptidstücken erfolgen, um eine eindeutige Bestätigung dieses Ergebnisses zu erhalten.

Mit Hilfe von anhand der Sequenz *kV* abgeleiteten spezifischen Primern konnten in einer RACE-Reaktion aus Gesamt-RNA von Körnern fünf Tage nach Anthese Teile der cDNA einer cytosolischen Phosphorylase aus dem Korn amplifiziert werden (vgl. III.4.3 und Abbildung). Die Nukleotidabfolge des 3'-RACE-Fragmentes, das dem C-terminalen Teil des Proteins entspricht, der „ck1“ genannten cDNA, konnte entschlüsselt werden und stimmt auf Aminosäureebene zu 97 % mit CB überein (Tabelle 14). Es war allerdings noch nicht möglich das 5'-RACE-Fragment, das dem

N-Terminus des Proteins entspricht, anzusequenzieren, da sich anscheinend an den Enden repetitive Nukleotidsequenzen befinden, die die Sequenzierung stören (Mitteilung der sequenzierenden Firma MWG). Das 5'-Fragment muss unter veränderten PCR-Bedingungen neu amplifiziert und neu kloniert werden, um es so der Sequenzierung zugänglich zu machen.

Auffällig ist, dass die Aminosäuresequenz von CK1 eine stärkere Ähnlichkeit von 98 % Identität zu der Aminosäuresequenz der Sonde T_aes_cyt aufweist als die von CB mit 94 % Identität. Dies bedeutet, dass *ck1* eventuell nicht auf das Korn beschränkt ist, sondern auch im Blatt exprimiert wird, da die Sonde aus Blatt-RNA amplifiziert wurde. Es könnte sich jedoch auch um drei verschiedene Sequenzen handeln, die von den drei Genomen des hexaploiden Weizens abstammen, was später ausführlich diskutiert wird (IV.4.2). In der cDNA-Bank aus Blättern konnte diese zweite Phosphorylasesequenz nicht entdeckt werden, da möglicherweise die Bank mit 9×10^5 unabhängigen Klone nicht umfassend genug war, oder diese Sequenz nur in geringen Mengen exprimiert wird. Es konnte z. B. auch keine Sequenz einer plastidischen Phosphorylase gefunden werden (s. unten). Das Fehlen von Sequenzen in der cDNA-Bank kann auch in der Beschaffenheit ihrer mRNA liegen, z. B. in einem hohen GC-Gehalt oder dem vermehrten Vorkommen von Sekundärstrukturen (Produktinformation Stratagene).

Die C-terminale Sequenz von CK1 unterscheidet sich sehr wenig von der Sequenz der anderen cytosolischen Phosphorylase CB. Alle Unterschiede betreffen jeweils nur eine Base eines für eine Aminosäure codierenden Triplets. Bei den meisten unterschiedlichen Aminosäuren handelt es sich darüber hinaus um Aminosäuren mit ähnlicher Ladung. Sogar die 3'-nicht-translatierten Bereiche stimmen fast vollständig überein. Es handelt sich bei den zwei cDNAs höchstwahrscheinlich um Allozyme. Auf dieses Problem wird weiter unten eingegangen. Zur Klärung der Relevanz von mindestens zwei cytosolischen Phosphorylasen im Weizen sollten Expressionsstudien mit spezifischen Sonden durchgeführt werden. Die 3'-Enden sind sich zu ähnlich, um aus diesem Bereich spezifische Sonden herstellen zu können. Daher muss zunächst das 5'-Ende von *ck1* sequenziert werden, möglicherweise eignet es sich besser zur Herstellung einer spezifischen Sonde.

Zur Überprüfung, ob es sich bei der cDNA *cb* um eine für ein funktionelles Protein codierende Nukleotidsequenz handelt, wurde sie in *E. coli* heterolog exprimiert (VIII.1). Zur vereinfachten Reinigung mittels einer Nickelchelatsäule wurde das Protein am N-Terminus mit einem His-Tag, bestehend aus sechs aufeinanderfolgenden Histidinen, versehen. Die heterologe Expression erwies sich allerdings als schwierig. Nachdem in dem herkömmlichen Expressionsstamm *E. coli* M15 nur zu kleine Expressionsprodukte gebildet wurden, stellte sich heraus, dass in der Weizensequenz

viele seltene Aminosäurecodons vorkommen. In nicht modifizierten *E. coli*-Stämmen sind für diese Codons zu wenige tRNAs vorhanden. In mit *cb* transformierten *E. coli* BL21-CodonPlus™-Zellen, die zusätzliche tRNA-Gene für seltene Codons tragen (CARSTENS & WAESCHE 1999), wurde ein Protein gebildet, welches mit 110 kD ca. 15 kD größer war, als anhand der Sequenzdaten zu erwarten gewesen wäre. Da Start- und Stoppcodon in dem verwendeten Vektor im richtigen Leseraster lagen, muss es sich um eine Anomalie im Laufverhalten des Proteins während der Elektrophorese gegenüber dem Laufverhalten des aus Blättern isolierten Proteins handeln. Da das heterolog exprimierte Protein darüber hinaus keine Phosphorylaseaktivität zeigte, scheint es auch fehlerhaft gefaltet zu sein.

IV.4.2 cDNAs plastidischer Phosphorylasen

Es war nicht möglich, aus der Blatt-cDNA-Bank cDNAs einer plastidischen Phosphorylase zu isolieren. Dies lag zum einen daran, dass die cDNA-Bank möglicherweise zu wenig unabhängige Klone enthielt, zum anderen aber auch daran, dass in jungen Blättern wesentlich weniger mRNA der plastidischen als der cytosolischen Phosphorylase vorhanden war. Dies konnte in semi-quantitativen PCR-Analysen mit Weizenblatt-RNA und den in Abbildung 19 gezeigten, für die jeweilige cDNA spezifischen Primern nachgewiesen werden (nicht abgebildet). Bei Erbsenblättern wurde dies auch beobachtet (BUCHNER et al. 1996). Aus einer Endosperm-spezifischen cDNA-Bank aus dem Weizen var. Minaret, die von der Arbeitsgruppe von S. de Pater des Center for Phytotechnology der Universität Leiden in den Niederlanden zur Verfügung gestellt wurde, konnte dennoch eine solche cDNA isoliert werden („s10“, Abbildung 19). Diese Sequenz diente zur Herstellung von Primern, mit deren Hilfe Teilsequenzen der Phosphorylasen aus dem Weizen var. Star isoliert werden konnten (Abbildung 20). Anhand dieser Teilsequenzen wurden RACE-taugliche Primer entworfen, die zur Amplifizierung von Phosphorylasefragmenten genutzt wurden, mit dem Ziel, auf diese Weise Vollängklone zu erhalten (vgl. Abbildung 21).

Aus der Weizensorte Star konnten acht Teilsequenzen plastidischer Phosphorylasen isoliert werden, von denen vier 5'-RACE-Fragmente waren und die anderen vier die dazugehörigen 3'-RACE-Fragmente (III.4.5). Je zwei 5'- und 3'-Enden wurden aus der Blatt-RNA (*pb2* und *pb3*) und je zwei 5'- und 3'-Enden aus der Korn-RNA isoliert (*pk1* und *pk2*). Die Nukleotidabfolgen der Fragmente sind jedoch noch nicht alle vollständig analysiert (vgl. Abbildung 23). Die Sequenzen selbst und ein Alignment aller Phosphorylasesequenzen aus Weizen sind im Anhang abgebildet (VIII.2). Von *pb3* konnte das 5'-RACE-Fragment, aufgrund repetitiver Sequenzabschnitte, wie sie auch bei *ck1* auftraten, noch nicht sequenziert werden (s. o.). Von *pb2* und *pk1* ist bisher nur der Beginn des 5'-RACE-Fragments bekannt, da bei der

weitergehenden Untersuchung ebenfalls Schwierigkeiten auftraten. Diese drei 5'-RACE-Fragmente müssen demnach nochmals mit veränderten PCR-Bedingungen amplifiziert und kloniert werden. *pk2* ist vollständig durchsequenziert und in Abbildung 22 dargestellt. Bei allen plastidischen Klonen, deren 5'-RACE-Fragment sequenziert werden konnte, fehlt die den plastidischen Phosphorylasen eigene Transitpeptidsequenz. Diese ist ca. 80 Aminosäuren lang (SONNEWALD et al. 1995). Nach Vergleichen mit bekannten Phosphorylasesequenzen ist zu erkennen, dass den Weizensequenzen insgesamt noch ca. 100 bis 150 Aminosäuren am 5'-Ende fehlen. Um diese Sequenzen zu erhalten, sollte eine weitere RACE-Reaktion mit neuen Primern durchgeführt werden, die relativ weit vorne auf den bereits bekannten Bereichen liegen, um das zu amplifizierende Fragment möglichst klein zu halten. Die 3'-RACE-Fragmente sind alle vollständig sequenziert und können miteinander verglichen werden.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz PK2 zeigt die höchste Ähnlichkeit von 80 % Identität zu dem Enzym aus der monokotylen Pflanze Reis (*Oryza sativa*). Ähnlichkeiten zu plastidischen Phosphorylasen dikotyler Pflanzen liegen zwischen 69 % (Süßkartoffel, *Ipomoea batatas*) und 75 % Identität (Spinat, *Spinacia oleracea*). Zu cytosolischen Phosphorylasen weist PK2 geringere Ähnlichkeiten von 60 % (Reis, *Oryza sativa*) bis 63 % Identität (Kartoffel, *Solanum tuberosum*) auf. Die Datenbankzugangsnummern der hier genannten Sequenzen sind in Abbildung 17 zu finden, die der plastidischen Phosphorylase aus Reis lautet AF327055. Das den plastidischen Phosphorylasen eigene Insert ist im Falle der PK2 78 Aminosäuren lang und somit genauso lang wie das aus Kartoffel und Süßkartoffel (NAKANO & FUKUI 1986 bzw. LIN et al. 1991). 45 % der Aminosäuren des Inserts von PK2 sind sauer oder geladen, was ein allgemeines Merkmal der Insertsequenzen ist (ALBRECHT et al. 2001). Aufgrund dieser vielen geladenen Aminosäuren wird angenommen, dass sich das Insert an der Oberfläche des Enzyms befindet (MORI et al. 1993).

Die vier aus Weizen var. Star isolierten C-terminalen Fragmente von plastidischen Phosphorylasen sind, wenn man die Sequenz des Inserts außer acht lässt, alle zu 98 % identisch zueinander (Tabelle 14). Die Ähnlichkeit ihrer Insertsequenzen variiert allerdings zwischen 85 % und 100 % Identität und die ihrer 3'-nicht translatierten Bereiche zwischen 32 % und 82 % Identität. Am deutlichsten ist der Unterschied zwischen den zwei aus Blättern isolierten cDNAs *pb2* und *pb3*. Auch in anderen Pflanzen wurden multiple plastidische Phosphorylasen entdeckt. In Extrakten von Erbsenblättern können nach nicht-denaturierender Gelelektrophorese zwei plastidische Phosphorylaseaktivitäten nachgewiesen werden (STEUP & LATZKO 1979). Über die zugehörigen Gensequenzen sind jedoch noch keine Informationen verfügbar. In Kartoffel wurde eine zweite plastidische Phosphorylase entdeckt und sequenziert (SONNEWALD et al. 1995). Die Sequenzen aus Kartoffel unterscheiden

sich stärker voneinander als diejenigen aus Weizen. So liegt die Ähnlichkeit des C-terminalen Teils der Sequenzen bei 84 % Identität und die des Insertbereichs nur bei 29 % Identität. Ähnlich unterschiedlich sind auch die Sequenzen der Transitpeptide der zwei plastidischen Phosphorylasen mit 22 % Identität, während ihre N-terminalen Bereiche 81 % Identität aufweisen. Über die Ähnlichkeit dieser letztgenannten Bereiche der plastidischen Phosphorylasen aus Weizen kann erst eine Aussage getroffen werden, wenn die Sequenzen vorliegen.

Die Herkunft so vieler leicht unterschiedlicher Sequenzen für Phosphorylasen lässt sich am besten durch die Hexaploidie des Weizens erklären. Viele Pflanzen besitzen polyploide Genome, in denen viele Gene oder sogar komplette Stoffwechselwege mehrfach vorkommen (SHOEMAKER et al. 1994, GRESSHOFF & LANDAU-ELLIS 1994). In hexaploidem Weizen wurden bereits 54 Enzyme identifiziert, die von analogen Genen der drei Genome codiert werden (HART 1983). Unterschiedliche Formen eines Enzyms, die von unterschiedlichen Genomen stammen, werden Allozyme genannt (MORELL et al. 1997). Die drei Genome des Weizen sind genetisch sehr ähnlich, da sie höchstwahrscheinlich von einem Urgenom abstammen (TAKUMI et al. 2000). Zusätzlich zu der vorhandenen Polyploidie kommt es in Pflanzen häufig zu lokalen Duplizierungen von Chromosomteilstücken, so dass ein Genlocus vielfach vorliegen kann (BANCROFT 2001). Ein Beispiel für das dreifache Vorkommen eines Gens in Weizen ist das der Stärkekorn-gebundenen Stärkesynthase (MURAI et al. 1999). Die Autoren identifizierten drei Gene, die zueinander Identitäten von 96 % bis 97 % aufwiesen, demnach fast genauso hoch wie die der plastidischen Phosphorylasen. Die drei Gene konnten je einem der Genome zugeordnet werden. Dies war ebenfalls bei den drei Genen des Homöobox-Proteins KNOTTED1 möglich (TAKUMI et al. 2000). Dessen drei Sequenzen zeigten jedoch eine noch höhere Identität von 99 % bis 100 % auf Aminosäureebene und sind somit stärker konserviert als die Phosphorylasen.

Eine Genomanalyse könnte zeigen, wieviele plastidische und cytosolische Phosphorylasegene in Weizen var. Star vorliegen. Es ist davon auszugehen, dass es jeweils mindestens drei Allozyme der beiden Phosphorylasen gibt. Weitere Gene könnten aus Genduplikationen hervorgegangen sein. Außerdem könnten manche Gene organspezifisch exprimiert werden, wie die zwei plastidischen Phosphorylasen aus Kartoffel, von denen nur eine in Blättern lokalisiert ist (SONNEWALD et al. 1995). Diese Fragen sollten mit spezifischen Sonden überprüft werden, die möglicherweise anhand der 3'-nicht-translatierten Bereiche konstruiert werden können.

Die Ähnlichkeit der plastidischen Phosphorylasesequenzen zu den cytosolischen Sequenzen aus Weizen liegt bei 68 % Identität, wenn man die Insertsequenz der plastidischen Proteine nicht in den Vergleich einbezieht. Einschließlich der

Insertsequenz sinken die Identitätswerte auf 51 % bis 61 % (Tabelle 14). Somit wären die meisten plastidischen Phosphorylasen aus Weizen den cytosolischen Phosphorylasen derselben Pflanze weniger ähnlich als den plastidischen Enzymen anderer Pflanzen. Es bleibt allerdings zu bedenken, dass die plastidischen Sequenzen noch nicht vollständig analysiert sind und so der konservierte N-terminale Bereich nicht in die Berechnung des Identitätswertes des gesamten Proteins miteinfließt. Eine Identität um 61 % oder darüber ist zu erwarten, wie die zwischen den Aminosäuresequenzen KV und der fast vollständigen Aminosäuresequenz PK2.

Tabelle 14: Vergleich von Phosphorylase-Primärsequenzen aus Weizenblättern und Weizenkörnern.

CB ist die Bezeichnung der abgeleiteten Aminosäuresequenz der aus der Blatt-cDNA-Bank, **CK1** die der aus Korn-RNA isolierten cytosolischen Phosphorylasesequenz. **PB2** und **PB3** bezeichnen die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der zwei aus Blatt-RNA und **PK1** und **PK2** die der zwei aus Korn-RNA isolierten plastidischen Phosphorylasesequenzen. Die Identitätsgrade sind in % angegeben. Bei den Vergleichen der cytosolischen Sequenzen mit den plastidischen Sequenzen wurden einmal die vollständigen Aminosäuresequenzen verglichen (1) und dann die Aminosäuresequenz des Insertbereiches der plastidischen Phosphorylasen weggelassen (2). Für die Sequenzen der plastidischen Phosphorylasen sind drei Identitätswerte gezeigt. Der erste Wert stammt aus dem Vergleich der Aminosäuresequenz ohne das Insert (2), der zweite Wert aus dem Vergleich der Insert-Aminosäuresequenzen (**Insert**) und der dritte Wert aus dem Vergleich der Nukleotidsequenzen der 3'-nicht-translatierten Bereiche (**3'-nt**).

CK1	PB2	PB3	PK1	PK2	
97	51	52	54	61	CB(1)
97	67	67	67	68	(2)
	55	58	57	59	CK1(1)
	67	69	69	68	(2)
		98	98	98	PB2(2)
		85	96	92	Insert
		32	82	64	3'-nt
			98	98	PB3(2)
			87	88	Insert
			54	61	3'-nt
				98	PK1(2)
				100	Insert
				63	3'-nt

Ein Vergleich zwischen den beiden hier angewendeten Methoden zur Klonierung von cDNAs, dem Screenen einer cDNA-Bank und der RACE-Methode, ergab, dass mit RACE einfacher und schneller auch seltene cDNAs identifiziert werden konnten. Der Nachteil der RACE-Methode lag in der Klonierung der PCR-Produkte, die oft mit Schwierigkeiten verbunden war, ebenso wie die nachfolgende Sequenzierung. Die mit Hilfe einer cDNA-Bank isolierten cDNAs waren bereits kloniert und weniger

problematisch in der Sequenzierung. Die Größe und Qualität der Bank ist für das Auffinden selten exprimierter mRNAs ausschlaggebend.

IV.5 AKTIVITÄT UND EXPRESSION

Phosphorylaseaktivität konnte in allen untersuchten Weizengeweben gefunden werden (Abbildung 29). Dies deutet darauf hin, dass die Phosphorylase im Metabolismus des Weizens eine Bedeutung hat. Allerdings zeigte das Verhältnis der cytosolischen Phosphorylase zur plastidischen Phosphorylase zeitliche und lokale Unterschiede. Aktivität der cytosolischen Phosphorylase war kurzzeitig in definierten Entwicklungsstadien nachweisbar, wohingegen Aktivität der plastidischen Phosphorylase zu jedem Zeitpunkt der Entwicklung der Pflanze vorhanden war. Dies spricht für eine punktuelle Funktion des cytosolischen und eine Dauerfunktion des plastidischen Enzyms.

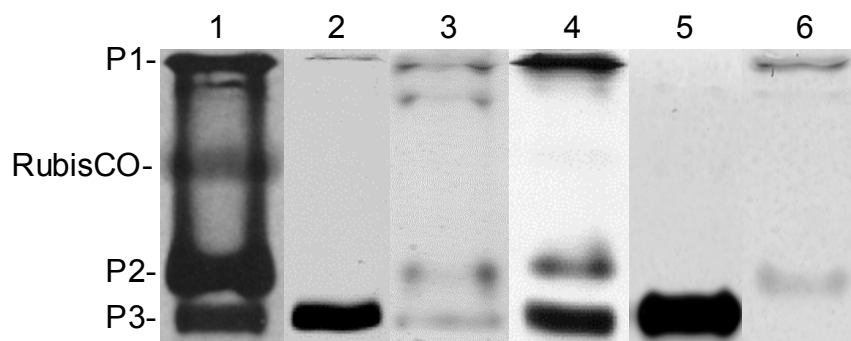


Abbildung 29: Zymogramm der stärkesynthetisierenden Phosphorylaseaktivität in Extrakten verschiedener Weizengewebe.

Die Auftrennung der Proben erfolgte durch PAGE in einem 7,5 %igen nicht-denaturierenden Gel mit 0,1 % einpolymerisiertem Glycogen. Durch Phosphorylaseaktivität während der Inkubation des Gels mit G1P gebildete Stärke wurde mit Jod blau angefärbt (II.2.4.4.1). Das Protein der RubisCO wird durch das Jod unspezifisch gelb angefärbt.

In Bahn 1 wurde ein konzentrierter Rohextrakt aus sechs Tage alten Blättern aufgetragen. In Bahn 2 ist ein Extrakt aus 20 Tage alten Blättern aufgetragen, in Bahn 3 ein Extrakt aus Wurzeln. Bahn 4 enthält einen Extrakt aus Weizenblüten vor der Anthese, Bahn 5 einen Extrakt aus sich entwickelnden Körnern 13 Tage nach Anthese und Bahn 6 einen Extrakt aus reifen, trockenen Körnern.

Bezeichnung der Phosphorylasen: **P1** = cytosolische Phosphorylase 1, **P2** = cytosolische Phosphorylase 2, **P3** = plastidische Phosphorylase, **RubisCO** = Ribulosebisphosphat-Carboxylase/Oxygenase.

IV.5.1 Aktivität und Expression der cytosolischen Phosphorylase

Die Aktivität der cytosolischen Phosphorylase ist in jungen Primärblättern stark ausgeprägt (Abbildung 29, Bahn 1). Sie bildet sich mit zunehmendem Blattalter stark zurück und ist in voll ausgebildeten Blättern kaum noch nachzuweisen (Abbildung 29, Bahn 2). Aus anderen Pflanzen liegen keine Befunde über die Abhängigkeit der Phosphorylase vom Pflanzenalter vor. In voll entwickelten Erbsenblättern wurde fest-

gestellt, dass die Aktivität der plastidischen Phosphorylase dreifach höher war als die der cytosolischen Phosphorylase (MATHESON & RICHARDSON 1976). In ausgebildeten Blättern dieser Pflanze spielt das cytosolische Enzym demnach, wie in Weizen, eine untergeordnete Rolle. Die Funktion der cytosolischen Phosphorylase an sich ist noch nicht geklärt. Es können mit Zunahme der verfügbaren Daten über das Enzym jedoch Thesen über dessen Funktion in der Pflanze aufgestellt werden. In das Primärblatt des Weizenkeimlings werden aus der Mobilisierung der Reservestärke stammende Mono- und Disaccharide transportiert (ZIEGLER 1995). Die Phosphorylase könnte durch Einbau dieser Zucker in ein im Cytosol vorhandenes lösliches Glucan, wie z. B. das von YANG & STEUP 1990 in Erbse und Spinat gefundene Heteropolyglucan, und durch dessen Abbau den cytosolischen G1P-Pool im Gleichgewicht halten (BUCHNER et al. 1996). Dies könnte die Akkumulation von Saccharose im Cytosol verhindern, wodurch möglicherweise der Stärkeabbau im Korn negativ beeinflusst würde (STITT 1984). An Getreidekeimlingen wurde gezeigt, dass osmotischer Stress zu einer Inhibition der Proteintranslation, z. B. auch der α -Amylase führte (THOMAS & RODRIGUEZ 1994). Ein rascher Einbau der in die Blattzellen transportierten Zucker, die nicht sofort in andere Stoffwechselwege fließen, in ein osmotisch nicht wirksames Glucan durch die Phosphorylase könnte diesen Stress und seine Auswirkungen verhindern.

Ähnlich könnte die Aufgabe der kurz vor und kurz nach dem Erscheinen der Antheren in der Blüte der Weizenpflanze auftretenden cytosolischen Phosphorylase sein (Abbildung 28 B, G und H). Das Erscheinen der Antheren, Anthese genannt, wird bei Weizen dem Zeitpunkt der Befruchtung gleichgesetzt und entspricht in Abbildung 28 dem Tag 1. Die hohe Phosphorylase-Transkriptmenge in der Blüte vor Anthese spiegelte sich nicht in einer ebenso dramatisch erhöhten Aktivität der cytosolischen Phosphorylase und in der durch den Antikörper detektierten Proteinmenge wieder. Es ist demnach nicht wahrscheinlich, dass das gesamte Transkript auch translatiert wurde. Protein- und Transkriptmenge der cytosolischen Phosphorylase verhalten sich gleich, was auf eine transkriptionelle Regulation hindeutet. Im Gen der plastidischen Phosphorylase aus Kartoffel konnten stromaufwärts des Initiationscodons negativ und positiv regulierende Sequenzelemente identifiziert werden (ST-PIERRE & BRISSON 1995b). Dies ist allerdings bisher die einzige Studie, die sich mit der transkriptionellen Kontrolle eines Phosphorylasegens befasste. Eine enorm erhöhte Transkriptmenge in der Blüte kurz vor der Anthese im Vergleich zu einer niedrigeren Transkriptmenge nach der Anthese wie bei der cytosolischen Phosphorylase wurde auch bei den Stärkesynthasen aus Weizen festgestellt. Stärkesynthase II aus dem Weizen var. Chinese Spring, Stärkesynthase III aus Weizen var. Gabo und die Stärkekorn-gebundene Stärkesynthase II aus den Weizen var. Chinese Spring und var. CD-1479 zeigen eine hohe Expression in der Blüte (LI et al. 1999, LI et al. 2000 bzw. VRINTEN & NAKAMURA 2000). Die Stärkesynthase II aus dem in dieser Arbeit

untersuchten Weizen var. Star wird allerdings nicht so stark in der Blüte exprimiert (Abbildung 28 E). In diesem Stadium bis zum dritten Tag nach der Anthese ist noch keine Entwicklung des Endosperms detektierbar (VRINTEN & NAKAMURA 2000). Die vegetativen Gewebe der Mutterpflanze transportieren jedoch schon Mono- und Disaccharide in das wachsende Korn (BEWLEY & BLACK 1994). Die daraus möglicherweise durch die Stärkesynthasen gebildete Stärke ist vorübergehend im Perikarp zu finden (VRINTEN & NAKAMURA 2000). Hier ist vielleicht ebenfalls ein cytosolischer G1P-Puffer nötig, zur Vorbereitung der Bildung des Endosperms.

Gegen Ende der Kornentwicklung wird nochmals das Transkript der cytosolischen Phosphorylase exprimiert und eine Erhöhung der Aktivität und Proteinmenge ist ebenfalls detektierbar (Abbildung 28 B, G und H). Aktivität und Protein sind im gereiften, trockenen Korn ebenfalls nachzuweisen, allerdings nur in der Embryo-haltigen Hälfte. Dies deutet darauf hin, dass das Protein während der Entwicklung des Korns im Embryo vorgebildet wird, da es bei der Keimung dort benötigt wird.

Tatsächlich konnte dann bei der Keimung von Weizenkörnern eine erhöhte Expression und Translation der cytosolischen Phosphorylase festgestellt werden. Im embryohaltigen Teil des Korns wurde mit der Sonde *t_aes_cyt* Phosphorylaseexpression festgestellt, während mit der für plastidische Phosphorylasen spezifischen Insertsonde kaum Expression detektiert wurde (Abbildung 26 A und B). Ein Zuwachs an cytosolischem Phosphorylaseprotein konnte mit dem spezifischen Antikörper festgestellt werden, wohingegen der direkte Nachweis der Phosphorylaseaktivität in den Kornextrakten mit Aktivitätsgelen durch den massiven Amylasegehalt erschwert wurde (Abbildung 26 H bzw. G). Amylasen sind im Weizen hauptsächlich verantwortlich für die Mobilisierung der Reservestärke (BECK UND ZIEGLER 1989). Die von der Phosphorylase im Gel gebildete Stärke wird von α - und β -Amylase höchstwahrscheinlich sofort wieder abgebaut, so dass keine quantitative Aussage möglich ist. Bei der Keimung von Erbsensamen wurde ebenfalls ein Anstieg der Aktivität und des Transkripts der cytosolischen Phosphorylase beobachtet (VAN BERKEL et al. 1991). In Erbsensamen wird die Stärke amylytisch und phosphorolytisch abgebaut, so dass eine verstärkte Expression der Phosphorylase im Zusammenhang mit der Mobilisierung der Reservestärke nicht verwundert (STEUP 1988). Das cytosolische Enzym erhält über die Auflösung der Amyloplastenmembran Zugang zu den Stärkekörnern und ist auch befähigt, diese anzugreifen (ZIEGLER 1995 bzw. KRUGER & AP REES 1983). Da eine signifikante Rolle der cytosolischen Phosphorylase bei dem Stärkeabbau im Weizenkorn aufgrund der Amylase-Aktivität auszuschließen ist, und darüber hinaus im Endosperm keine Phosphorylaseexpression und Aktivität gefunden werden konnte (Abbildung 26 D und E und III.5.3), bleibt die Rolle der cytosolischen Phosphorylase auch bei der Keimung weiterhin ungeklärt. Möglicherweise ist die Phosphorylase im embryohaltigen Teil des Weizenkorns ebenfalls für die Auf-

rechterhaltung eines G1P-Gleichgewichts zuständig. Die Feststellung, wo die cytosolische Phosphorylase im Embryo genau lokalisiert ist, könnte weitere Einblicke in ihre Funktion geben.

Eine zentrale Funktion im Stärkemetabolismus scheint das cytosolische Enzym in Weizen nicht zu haben, da es nach bisherigen Erkenntnissen keinen Zugang zu Stärke hat. Es ist nicht im Chloroplasten und auch nicht im Endosperm lokalisiert. Gegen eine Funktion im Stärkemetabolismus spricht auch, dass Kartoffelpflanzen, deren Expression der cytosolischen Phosphorylase durch Antisensekonstrukte inhibiert wurde, einen kaum veränderten Kohlenhydrat-Metabolismus zeigten (DUWENIG et al. 1997a). Vielmehr wiesen die Kartoffelpflanzen eine vermehrte Biomasse, einen weitgehenden Verlust der Apikaldominanz und verminderte Glucose- und Fructosegehalte auf. Die Autoren vermuten, dass die cytosolische Phosphorylase durch spezifische Spaltung, z. B. das cytosolische Heteropolyglucan (YANG & STEUP 1990) modifiziert und so Oligosaccharidsignale gebildet werden, die möglicherweise eine Rolle im Pflanzenwachstum und der Entwicklung haben könnten (DUWENIG et al. 1997a bzw. RYAN et al. 1987). In *Dictyostelium* konnte für eine der zwei Glycogen-Phosphorylasen des Wurms eine Rolle in der Zelldifferenzierung und damit in der Entwicklung dieses Organismus nachgewiesen werden (WARNER & RUTHERFORD 2000).

IV.5.2 Aktivität und Expression der plastidischen Phosphorylase

Eine hohe Aktivität der in den Chloroplasten von Weizenblättern lokalisierten Phosphorylase (SCHUPP 1997) konnte, im Gegensatz zu der rasch abfallenden Aktivität der cytosolischen Phosphorylase, über fast die gesamte Lebensdauer der Blätter nachgewiesen werden (Abbildung 29, Bahn 2). Dies spricht für eine grundlegende Dauerfunktion des plastidischen Enzyms im Blatt. Eine solche Funktion könnte die Beteiligung an dem diurnalen Auf- und Abbau transitorischer Blattstärke sein. In ausgebildeten Blättern von Kartoffelpflanzen und *Mesembryanthemum* wurde ein Tagesgang der Aktivität der plastidischen Phosphorylase gemessen, der ein Maximum gegen Ende der Lichtperiode zeigte (ALBRECHT et al. 2001 bzw. PAUL et al. 1993). Es wird eine Beteiligung des plastidischen Enzyms an der Synthese der transitorischen Stärke vermutet, wobei die Aktivität auf Transkriptionsebene reguliert werden soll (ALBRECHT et al. 2001). Im Weizenblatt konnte kein Tagesgang der Phosphorylaseaktivität festgestellt werden (nicht abgebildet). Die in Blattextrakten gemessenen Aktivitäten müssen den *in vivo*-Verhältnissen im Blatt jedoch nicht entsprechen. Möglicherweise fluktuieren die Konzentrationen von Inhibitoren wie Maltotetraose (STEUP 1988) oder Substraten wie Phosphat oder G1P diurnal und beeinflussen die Phosphorylaseaktivität *in situ*. Da in Kartoffelblättern eine transkriptionelle Regulation der diurnalen Aktivität vorliegt, sollte die Expression von Phosphorylasetranskript im Laufe des Tages in Weizenblättern überprüft werden. Es ist allerdings nicht gewähr-

leistet, dass alle Pflanzen einen Tagesgang der Phosphorylaseaktivität gleicher Gestalt aufweisen. In Spinat konnte wie in Weizen kein Tagesgang nachgewiesen werden und in der Fingerhirse hat die Phosphorylase ihre höchste Aktivität am Ende der Dunkelperiode und nicht am Ende der Lichtperiode (PONGRATZ & BECK 1978 bzw. SHATTERS & WEST 1995).

Eine Phosphorylaseaktivität, die nach ihrem elektrophoretischen Laufverhalten der chloroplastischen Blattphosphorylase ähnlich ist (Abbildung 29), ist mit hohen Aktivitäten im Endosperm von Weizenkörnern eines frühen Entwicklungsstadiums vertreten (Abbildung 27 und Abbildung 28 G). Diese Phosphorylase ist aller Wahrscheinlichkeit nach in den Amyloplasten des Endosperms lokalisiert, wie die plastidische Kornphosphorylase aus Mais (YU et al. 2001). Diese Lokalisierung der plastidischen Weizenphosphorylase in den Amyloplasten konnte allerdings nicht bewiesen werden, da die Präparation der Amyloplasten nach der Methode von TETLOW et al. (1993) fehlschlug. Diese Methode bedarf für den Weizen var. Star einer Optimierung.

In sich entwickelnden Weizenkörnern war das Transkript der plastidischen Phosphorylase in den ersten Tagen nach der Blüte nachweisbar (Abbildung 28 C). Diese transiente Expression, zusammen mit der entsprechend hohen Aktivität während der Anfangsphase der Stärkebildung im Endosperm, ist ein Hinweis auf eine potenzielle Rolle der plastidischen Phosphorylase bei der Synthese der Reservestärke im Korn. Obwohl lange vermutet wurde, dass Phosphorylasen nur am Stärkeabbau beteiligt sind, mehren sich nun Indizien für eine Funktion des plastidischen Enzyms in der Biosynthese der Stärke. So wurde in mehreren Pflanzen ein Anstieg der Phosphorylaseaktivität und der –transkription während der Synthese der Reservestärke gefunden (Saubohne: BUCHNER et al. 1996, Kartoffel: ST-PIERRE & BRISSON 1995a, Erbse: VAN BERKEL et al. 1991). Wie in den Saubohnensamen wird während der Stärkesynthese in den Weizenkörnern Transkript der plastidischen Phosphorylase exprimiert (Abbildung 28 C und BUCHNER et al. 1996). Allerdings erscheint das Transkript der plastidischen Phosphorylase in der Bohne erst 30 Tage nach der Befruchtung, während es in Weizen wesentlich früher nachweisbar ist, schon ab Tag 1 nach Anthese. Wie in der Bohne entspricht das Ausmaß der Aktivität der Phosphorylase nicht unmittelbar der Transkriptmenge, denn die mRNA-Menge nimmt lange vor der entsprechenden Proteinaktivität ab (Abbildung 28 C, G und BUCHNER et al. 1996). Bei der plastidischen Phosphorylase handelt es sich also im Gegensatz zu dem cytosolischen Enzym um ein in der Pflanze stabiles Protein mit einer relativ langen Halbwertszeit. Die Ursache des Anstiegs der Phosphorylaseaktivität nachdem keine Transkriptmenge mehr nachgewiesen werden kann ist ungeklärt, da bisher keine Berichte über eine mögliche Aktivierung von Phosphorylasen vorliegen. Wie lange die Phosphorylase tatsächlich ihre Aktivität behält, lässt sich in den sich entwickelnden Weizenkörnern aus den gleichen Gründen wie in den keimenden Wei-

zenkörnern nicht sicher bestimmen. Durch die Extraktion werden Amylasen freigesetzt, die wiederum höchstwahrscheinlich die durch die Phosphorylase gebildete Stärke im Aktivitätsgel oder auch im Aktivitätstest abbauen. Mit einem spezifischen Antikörper gegen die plastidische Phosphorylase könnte deren Vorkommen auch in Kornextrakten mit Amylaseaktivität in Zukunft nachgewiesen werden.

Das Expressionsmuster, welches die plastidische Phosphorylase bei der Entwicklung von Weizenkörnern zeigt, ähnelt sehr den Expressionsmustern Stärke-synthetisierender Enzyme. Das Muster entspricht fast den Expressionsmustern der in denselben Körnern untersuchten großen Untereinheit der AGPase und der Stärkesynthase II (Abbildung 28 D bzw. E). Deren in Weizen var. Star detektierte Expression ist den bereits publizierten Ergebnissen aus Weizen var. Chinese Spring anderer Autoren sehr ähnlich (AINSWORTH et al. 1995 bzw. LI et al. 1999). Beide mRNAs werden in Weizen var. Star jedoch schon etwas früher exprimiert als in Weizen var. Chinese Spring. Dies könnte daran liegen, dass in der vorliegenden Arbeit im Unterschied zu der publizierten Arbeit über die Stärkesynthase II vollständige Weizenkörner und nicht nur Endosperm als Probenmaterial verwendet wurden. Die Arbeit über die AGPase verwendete jedoch ebenfalls vollständige Weizenkörner, so dass es sich möglicherweise um Unterschiede in den Expressionsmustern zwischen den Varietäten handelt. Eine Wiederholung der Analysen mit Proben aus reinem Endosperm könnte diese Frage beantworten.

Eine Induzierbarkeit durch Saccharose wurde bei den Stärke-synthetisierenden Enzymen AGPase (große Untereinheit), Stärkesynthase III und Branching Enzym in Kartoffelblättern gefunden (MÜLLER-RÖBER et al. 1990, ABEL et al. 1996, bzw. KOßMANN et al. 1991). Die Anlieferung von Saccharose, z. B. durch die Photosynthese stimuliert somit ihre Verarbeitung zu Stärke. Erhöhte Transkription auch des Gens der plastidischen Phosphorylase nach exogener Zugabe von Saccharose konnte in Kartoffel- und Spinatblättern gezeigt werden (ST-PIERRE & BRISSON 1995a bzw. DUWENIG et al. 1997b). Dieses, den Stärke-synthetisierenden Enzymen ähnliche Induktionsverhalten der plastidischen Phosphorylase ist ein weiteres Indiz für ihre Beteiligung an der Stärkesynthese. Dieses Experiment sollte auch für Weizen durchgeführt werden, um nachzuprüfen, ob dessen plastidische Phosphorylase ebenfalls durch Saccharose induzierbar ist und sich in diesem Punkt ebenfalls, wie schon in der Transkription während der Kornentwicklung, wie die Syntheseeenzyme verhält.

Nachdem festgestellt worden war, dass die AGPase und das Branching Enzym ähnliche Expressionsmuster zeigten, wurde für die Expression von Genen, die Stärke-biosynthetische Enzyme codieren, eine koordinierte Regulation postuliert (KOßMANN et al. 1991). Die plastidische Phosphorylase scheint der gleichen Regulation zu unterliegen, also möglicherweise an der Stärkesynthese beteiligt zu sein.

Unterstützt wird diese These durch Publikationen über koordinierte Expression in prokaryotischen Systeme. In *E. coli* werden die Glycogen-synthetisierenden Enzyme, die Enzyme der Gluconeogenese und die Glycogen-Phosphorylase durch ein gemeinsames Regulatorprotein (*csrA*, carbon storage regulator) negativ moduliert (YANG et al. 1996). In *Agrobacterium tumefaciens* und *Bacillus stearothermophilus* ist die Glycogen-Phosphorylase Teil des Glycogen-Operons, welcher zusätzlich die AGPase, das Branching Enzyme und die Glycogen-Synthase enthält (UGALDE et al. 1998 bzw. TAKATA et al. 1997). Diese Gene werden durch denselben Promotor kontrolliert und als ein Transkript exprimiert.

Die Funktion, welche die plastidische Phosphorylase in der Stärkesynthese ausführt ist nicht bekannt. Eine Möglichkeit wäre die Katalysierung spezifischer Spaltreaktionen, wie es für Debranching Enzyme vorgeschlagen wurde (BALL et al. 1996, MOUILLE et al. 1996). Diese spalten von einem höher verzweigten Vorläufer des Amylopektins (Präamylopektin) die überschüssigen Verzweigungen ab, so dass als Endprodukt Amylopektin entsteht. In diesem Prozess könnte die Phosphorylase spezifisch z. B. zu lange Seitenketten kürzen (ALBRECHT et al. 2001). Eine alternative Funktion der plastidischen Phosphorylase in der Stärkesynthese wurde 1998 von TAKAHA et al. ebenfalls im Zusammenhang mit diesem Modell der diskontinuierlichen Stärkesynthese („discontinuous synthesis model“, BALL et al. 1996) bzw. des „glucan-trimming“-Modells (MYERS et al. 2000) vorgeschlagen. Die Phosphorylase könnte in Zusammenarbeit mit dem D-Enzym die, laut dieser Modelle durch das Trimmen eines Präamylopektins zu Amylopektin anfallenden, kurzkettigen Maltooligosaccharide zu G1P abbauen (TAKAHA et al. 1998). Das freigesetzte G1P könnte von der AGPase wieder zur Synthese von Stärke verwendet werden. Unterstützt wird dieser Vorschlag durch den Befund, dass die Aktivität der Phosphorylase aus *Chlamydomonas reinhardtii* durch die Anwesenheit des D-Enzyms stimuliert wurde (COLLEONI et al. 1999). Eine weitere Möglichkeit wäre eine polymerisierende Funktion der Phosphorylase in der Stärkesynthese. Eine der plastidischen Phosphorylasen aus Kartoffelknollen hat eine biosynthetische Aktivität, die keinen exogenen Primer benötigt (TANDECARZ et al. 1978, ALBRECHT et al. 2001). Diese Aktivität könnte in der Initiation der Stärkekornbildung ausgenutzt werden (ALBRECHT et al. 2001). Werden Kartoffeln bei 30 °C angezogen, so zeigen sie fast keine Aktivität der löslichen Stärkesynthasen mehr, aber einen normalen Stärkegehalt (MANGAT & BADENHUIZEN 1971). Es wird diskutiert, dass die Phosphorylasen die Hauptenzyme der Stärkesynthese sein könnten, wobei die Stärkesynthasen dann ein Notsystem zur Kompensation eines Ausfalls der Phosphorylasen wären (ERLANDER 1998).

V ZUSAMMENFASSUNG

Pflanzliche α -Glucan-Phosphorylasen (EC 2.4.1.1) sind Enzyme, die Stärke sowohl synthetisieren als auch abbauen können. In Blättern und Körnern des Weizen var. Star können drei Phosphorylaseformen (P1, P2 und P3) mittels nicht-denaturierender Elektrophorese im Glycogen-haltigen Polyacrylamidgel unterschieden werden. Zwei der Formen (P1 und P2) sind cytosolische Enzyme, jedoch hat nur P1 die den cytosolischen Phosphorylasen eigene hohe Bindungsaffinität zu verzweigten Polyglucanen. Die dritte Form (P3) ist plastidisch und zeigt die für diese Phosphorylaseform typische höhere katalytische Affinität zu Maltooligosacchariden verglichen mit verzweigten Polyglucanen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die cytosolische Phosphorylase aus Weizenblättern mittels einer Affinitätschromatographie an dem an Sepharose gekoppelten Aktivitätsinhibitor Cycloheptaamylose bis zur Homogenität gereinigt. Die Phosphorylase besteht aus einem einzigen Polypeptid, das nach denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese ein Molekulargewicht von ca. 92 kD aufweist. Sie hat eine spezifische phosphorolytische Aktivität von 57 U/mg Protein, was einer ca. 7000-fachen Anreicherung bei einer Ausbeute von 32 % entspricht. Da das Protein die beiden Phosphorylaseformen P1 und P2 bildet, liegt es vermutlich in zwei verschiedenen Formen vor, von denen eine eine Maskierung des Polyglucan-Bindungsbereichs aufweist.

Die höchste Aktivität hat die gereinigte cytosolische Weizen-Phosphorylase, wie andere cytosolische Phosphorylasen, sowohl in der abbauenden als auch in der synthetisierenden Reaktion mit großen, verzweigten Polyglucanen als Substrate verglichen mit linearen Maltooligosacchariden als Substrate. Ihre katalytische Affinität zu Amylopektin ist in der abbauenden Reaktion ca. 30mal höher als zu Maltoheptaose, in der Synthesereaktion sogar ca. 150mal höher. Die Umsatzgeschwindigkeiten mit verschiedenen Glucanen als Substrat sind in der Synthesereaktion vier- bis siebenmal höher als in der abbauenden Reaktion. Maltopentaose ist das kleinste Substrat, das abgebaut werden kann, während bereits Maltotetraose als Primer für die Glucansynthese dienen kann. Das pH-Optimum der abbauenden Reaktion liegt mit pH 7,0 etwas höher als das der Synthesereaktion (pH 6,0). Reduzierende Agenzien haben keinen Einfluss auf die Aktivitäten der cytosolischen Phosphorylase.

Gegen das Protein der cytosolischen Phosphorylase wurden polyklonale Antikörper hergestellt. Sie reagierten mit der gereinigten cytosolischen Phosphorylase und entsprechend großen Polypeptiden in Weizenextrakten, nicht aber mit Proteinen von Extrakten, die nur plastidische Phosphorylase enthielten. In hoher Konzentration re-

agierte das Serum im Westernblot-Verfahren auch mit anderen Proteinen von Weizenextrakten, schien aber in geeigneter Verdünnung spezifisch für die cytosolische Phosphorylase zu sein.

Aus einer cDNA-Bank aus jungen Weizenblättern wurde die cDNA einer cytosolischen Phosphorylase kloniert. Das erste Methionin (Met 20) der abgeleiteten Aminosäuresequenz des von Anfang an offenen Leserasters der cDNA stellt mit höchster Wahrscheinlichkeit den Translationsstart dar. Auch nach Verlängerung des 5'-Endes um 87 Basen in 5'-Richtung konnte kein Stoppcodon, aber auch keine Codierung für ein weiteres Methionin entdeckt werden. Eine cDNA einer plastidischen Phosphorylase konnte nicht aus der Blatt-cDNA-Bank isoliert werden, aber aus einer cDNA-Bank aus Endosperm einer anderen Weizensorte. Die Sequenzen der beiden cDNAs dienten zur Herstellung von spezifischen Primern, mit denen Fragmente von Phosphorylase-cDNAs aus Blättern und Körnern des Weizen var. Star amplifiziert werden konnten. Durch RACE konnten mit anhand dieser Fragmente hergestellten Primern cDNAs einer cytosolischen Phosphorylase aus Körnern und je zweier plastidischer Phosphorylasen aus Blättern und Körnern amplifiziert werden, die nur an den 5'-Enden noch vervollständigt werden müssen.

In Blättern ist die Aktivität der cytosolischen Phosphorylase weitgehend auf junge, stark wachsende Primärblätter beschränkt. In Körnern wird sie während der späten Kornentwicklung höchstwahrscheinlich im Embryo gebildet und bleibt dort aktiv während der Keimung. Somit könnte die cytosolische Phosphorylase wichtig für die Aufrechterhaltung eines cytosolischen Glucose-1-Phosphatpools in Geweben sein, die massiv antransportierte Reservestärke-Abbauprodukte zur Verwendung im Wachstum des Keimlings verarbeiten müssen. Die Aktivität der plastidischen Phosphorylase bleibt langfristig in ausgewachsenen Blättern erhalten. Sie ist vermutlich am Metabolismus der transitorischen Stärke dieser Blätter beteiligt, zeigt aber keine diurnale Aktivitätsschwankung. Eine transient hohe Aktivität zeigte die plastidische Phosphorylase ebenfalls beim Einsetzen massiver Stärkesynthese im sich entwickelnden Korn. Da auch das Expressionsmuster ihres Transkripts dem der Stärkesynthetisierenden Enzyme ADP-Glucose-Pyrophosphorylase und Stärkesynthase ähnelt, spielt die plastidische Phosphorylase möglicherweise eine Rolle bei der Initiierung der Synthese von Reservestärke.

VI SUMMARY

Plant α -glucan phosphorylases (EC 2.4.1.1) are enzymes which can synthesize starch as well as degrade it. In leaves and seeds of the wheat cultivar "Star" three forms of phosphorylase (P1, P2 and P3) can be distinguished by electrophoresis in non-denaturing polyacrylamide gels containing glycogen. Two of the forms (P1 and P2) are cytosolic enzymes, but only P1 shows the strong binding affinity to branched polyglucans typical of cytosolic phosphorylases. The third form (P3) is plastidic and exhibits the higher catalytic affinity to maltooligosaccharides than to branched polyglucans typical of plastidic phosphorylases.

In the present study the cytosolic phosphorylase of wheat leaves was purified to homogeneity by affinity chromatography on the activity inhibitor cycloheptaamylose coupled to Sepharose. The purified phosphorylase consists of a single polypeptide species which has a molecular weight of approximately 91,5 kD according to denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. It has a specific phosphorolytic activity of 57 U/mg protein, corresponding to a purification factor of about 7000-fold and a yield of 32 %. The purified protein corresponds to both P1 and P2 and their differing binding affinities to glycogen. It thus probably occurs in two different forms, in one of which the polyglucan-binding region of the enzyme is masked.

The purified cytosolic phosphorylase of wheat is much more active with branched polyglucans than with linear maltooligosaccharides as substrates in both the synthesis and the degradation of glucans, as are other non-plastidic phosphorylases. The catalytic affinity of the wheat enzyme to amylopectin is 30-fold higher than to maltoheptaose during phosphorolysis and as much as 150-fold higher respective of glucan synthesis. The maximum velocity of the synthesizing reaction with various glucans as substrates is four to seven times higher than that of the degrading reaction. The smallest substrate which can be degraded by the cytosolic phosphorylase is maltopentaose, whereas the smaller maltotetraose is sufficiently long to be a primer in the synthesis of reaction. The pH-optimum of the degrading reaction (pH 7.0) is slightly more alkaline than that of the synthesizing reaction (pH 6.0). Reducing agents had no influence on the activities of the cytosolic phosphorylase.

The protein of the cytosolic phosphorylase was used to raise polyclonal antibodies which reacted with the purified cytosolic phosphorylase and proteins of a corresponding size in extracts of wheat tissues. They did not react with any proteins in extracts containing only the plastidic phosphorylase. At high concentrations the

antiserum reacted with other proteins of wheat extracts in Western blot analysis, but it was essentially specific for the cytosolic phosphorylase at appropriate dilution.

A cDNA of a cytosolic phosphorylase was isolated by screening a cDNA library of young wheat leaves. Although the cDNA consists of an open reading frame from its 5'-inception, the first methionine of the deduced amino acid sequence of the cDNA (Met 20) most probably constitutes the initial amino acid of the translated protein. No stop codon or further methionine codon was detected upon extending the 5'-end for 87 base pairs. No cDNA coding for a plastidic phosphorylase could be isolated from the leaf cDNA, but a fragment of such a cDNA was isolated from a cDNA library of the endosperm of another wheat cultivar. The sequences of the two cDNAs were used to design primers to amplify fragments of phosphorylase cDNAs of leaves and seeds of the wheat cultivar "Star". Specific primers deduced from the sequences of these fragments were used to amplify cDNAs of a cytosolic phosphorylase of seeds and of two plastidic phosphorylases of each of leaves and seeds by RACE. These cDNAs are all complete at their 3'-ends, but must still be brought to completion at their 5'-ends.

In leaves activity of the cytosolic phosphorylase is mostly restricted to young growing primary leaves. In seeds the enzyme accumulates in the embryo during the late phase of seed development and remains active there throughout germination. The cytosolic phosphorylase could therefore be important for maintaining a cytosolic glucose-1-phosphate pool in tissues which process incoming reserve starch degradation products. Activity of the plastidic phosphorylase is detectable in fully grown leaves for an extended duration. It is presumably involved in the metabolism of transitory starch of these leaves, although no diurnal variation of its activity could be detected. A transient peak of activity of the plastidic phosphorylase was observed during the onset of massive starch synthesis in developing seeds. As the pattern of the transcript expression of this enzyme resembles that of the starch synthesizing enzymes ADP-glucose pyrophosphorylase and starch synthase, it can be expected that the plastidic phosphorylase plays a role in the initiation of reserve starch synthesis.

VII LITERATURVERZEICHNIS

- ABEL GJW, SPRINGER F, WILLMITZER L, KOßMANN J (1996) Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a novel 139 kDa starch synthase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J* **10**: 981-991
- AINSWORTH C, HOSEIN F, TARVIS M, WEIR F, BURRELL M, DEVOS KM, GALE MD (1995) Adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase genes in wheat: Differential expression and gene mapping. *Planta* **197**: 1-10
- ALBRECHT T (1998) Quartärstruktur, Funktion und Lokation der Pho1-Phosphorylasen aus *Solanum tuberosum* L. Dissertation, Universität Potsdam
- ALBRECHT T, GREVE B, PUSCH K, KOßMANN J, BUCHNER P, WOBUS U, STEUP M (1998) Homodimers and heterodimers of Pho1-type phosphorylase isoforms in *Solanum tuberosum* L. as revealed by sequence-specific antibodies. *Eur J Biochem* **251**: 343-352
- ALBRECHT T, KOCH A, LODE A, GREVE B, SCHNEIDER-MERGENER J, STEUP M (2001) Plastidic (Pho1-type) phosphorylase isoforms in potato (*Solanum tuberosum* L.) plants: Expression analysis and immunochemical characterization. *Planta* **213**: 602-613
- BABA, T & KAINUMA K (1987) Partial hydrolysis of sweet potato starch with β -amylase. *Agric Biol Chem* **51**: 1365-1371
- BALL S, GUAN H-P, JAMES M, MYERS A, KEELING P, MOUILLE G, BULÉON A, COLONNA P, PREISS J (1996) From glycogen to amylopectin: A model for the biogenesis of the plant starch granule. *Cell* **86**: 349-352
- BANCROFT I (2001) Duplicate and diverge: the evolution of plant genome microstructure. *TIG* **17**: 89-93
- BECK E, PONGRATZ P, REUTER I (1981) The amylolytic system of isolated spinach chloroplasts and its role in the breakdown of assimilatory starch. *In*: Photosynthesis IV. Regulation of carbon metabolism. AKOYUNOGLU G, ed., Balaban International Science Services, Philadelphia, PA: 529-538
- BECK E & ZIEGLER P (1989) Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **40**: 95-117
- BECKER J-U, WINGENDER-DRISSEN R, SCHILTZ E (1983) Purification and properties of phosphorylase from baker's yeast. *Arch Biochem Biophys* **225**: 667-678
- BENTON WD & DAVIS RW (1977) Screening λ gt recombinant clones by hybridisation to single plaques *in situ*. *Science* **196**: 180-182
- BEWLEY JD & BLACK M (1994) Seeds. Physiology of development and germination. Plenum Press, New York
- BOCCA SN, ROTHSCHILD A, TANDECARZ JS (1997) Initiation of starch biosynthesis: Purification and characterization of UDP-glucose: protein transglucosylase from potato tubers. *Plant Physiol Biochem* **35**: 205-212

- BRADFORD MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem* **72**: 248-254
- BRISSON N, GIROUX H, ZOLLINGER M, CAMIRAND A, SIMARD C (1989) Maturation and subcellular compartmentation of potato starch phosphorylase. *Plant Cell* **1**: 559-566
- BUCHNER P, BORISJUK L, WOBUS U (1996) Glucan phosphorylases in *Vicia faba* L.: Cloning, structural analysis and expression patterns of cytosolic and plastidic forms in relation to starch. *Planta* **199**: 64-73
- BULLOCK WO, FERNANDEZ JM, SHORT JM (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection. *Bio-techniques* **5**: 376-379
- BURR B & NELSON OE (1975) Maize α -glucan phosphorylase. *Eur J Biochem* **56**: 539-546
- CAMIRAND A, ST-PIERRE B, MARINEAU C, BRISSON N (1990) Occurrence of a copia-like transposable element in one of the introns of the potato starch phosphorylase gene. *Mol Gen Genet* **224**: 33-39
- CARSTENS CP & WAESCHE A (1999) Codon bias-adjusted BL21 derivatives for protein expression. *Strategies* **12**: 49-51
- CHANG CW (1982) Enzymic degradation of starch in cotton leaves. *Phytochemistry* **21**: 1263-1269
- CHANG T-C & SU J-C (1986) Starch phosphorylase inhibitor from sweet potato. *Plant Physiol* **80**: 534-538
- CHENCHIK A, MOQADAM F, SIEBERT P (1996) A new method for full-length cDNA cloning by PCR. *In: A Laboratory Guide to RNA: Isolation, Analysis and Synthesis*. KRIEG PA, ed., Wiley-Liss, Inc: 273-321
- CHOI Y-L, KAWAMUKAI M, UTSUMI R, SAKAI H, KOMANO T (1989) Molecular cloning and sequencing of the glycogen phosphorylase gene from *Escherichia coli*. *FEBS* **243**: 193-198
- CHOMCZYNSKI P (1992) One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting DNA and RNA. *Analytical Biochem* **201**: 134-139
- COLLEONI C, DAUVILLÉ D, MOUILLE G, MORELL M, SAMUEL M, SLOMIANY M-C, LIÉNARD L, WATTEBLED F, D'HULST C, BALL S (1999) Biochemical characterization of the *Chlamydomonas reinhardtii* α -1,4 glucanotransferase supports a direct function in amylopectin biosynthesis. *Plant Physiol* **120**: 1005-1014
- COMMISSION ON PLANT GENE NOMENCLATURE (1994) Nomenclature of sequenced plant genes. *Plant Mol Biol Reporter* **12**: CPGn supplement
- CONRADS J, VAN BERKEL J, SCHÄCHTELE C, STEUP M (1986) Non-chloroplast α -1,4-glucan phosphorylase from pea leaves: Characterization and in situ localization by indirect immunofluorescence. *Biochim Biophys Acta* **882**: 452-463
- CRIMMINS DL, MCCOURT DW, THOMA RS, SCOTT MG, MACKE K, SCHWARTZ BD (1990) *In situ* chemical cleavage of proteins immobilized to glass-fiber and polyvinylidenedifluoride membranes: Cleavage at tryptophane residues with 2-(2'-

- nitrophenylsulfenyl)-3-methyl-3'-bromindolenine to obtain internal amino acid sequence. *Analytical Biochem* **187**: 27-38
- DEVEREUX J, HAEBERLI P, SMITHIES O (1983) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl Acid Res* **12**: 387-395
- DUWENIG E, STEUP M, WILLMITZER L, KOßMANN J (1997a) Antisense inhibition of cytosolic phosphorylase in potato plants (*Solanum tuberosum* L.) affects tuber sprouting and flower formation with only little impact on carbohydrate metabolism. *Plant J* **12**: 323-333
- DUWENIG E, STEUP M, KOßMANN J (1997b) Induction of genes encoding plastidic phosphorylase from spinach (*Spinacia oleracea* L.) and potato (*Solanum tuberosum* L.) by exogenously supplied carbohydrates in excised leaf discs. *Planta* **203**: 111-120
- EDMAN P & BEGG G (1967) A protein sequenator. *J Eur Biochem* **1**: 80-91
- ERLANDER SR (1998) Starch biosynthesis 3: The glycogen precursor mechanism using phosphorylase in the production of the precursor glycogen. *Starch* **50**: 319-330
- FUKUI T, SHIMOMURA S, NAKANO K (1982) Potato and rabbit muscle phosphorylases: Comparative studies on the structure, function and regulation of regulatory and nonregulatory enzymes. *Mol Cell Biochem* **42**: 129-144
- FUKUI T (1983) Plant phosphorylases: Structure and function. *In*: The new frontiers in plant biochemistry. AKAZAWA T, ASAHI T, IMASEKI H, eds. Nijhoff/Junk, The Hague: 71-82
- FUKUI T, NAKANO K, TAGAYA M, NAKAYAMA H (1987) Phosphorylase isozymes of higher plants. *In*: Biochemistry of Vitamin B. Korpela T & Christen P, eds. Birkhauser Verlag, Basel: 267-276
- FUKUI T, TANIZAWA K, MORI H (1991) Potato tuber type-H phosphorylase isozyme. Molecular cloning, nucleotide sequence and expression of a full-length cDNA in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **266**: 18446-18459
- GERBRANDY SJ & DOORGEEST A (1972) Potato phosphorylase isoenzymes. *Phytochemistry* **11**: 2403-2407
- GERBRANDY SJ (1974) Glycogen phosphorylase of potatoes: Purification and thermodynamic properties of the adsorption on glycogen. *Biochim Biophys Acta* **370**: 410-418
- GRESSHOFF PM & LANDAU-ELLIS D (1994) Molecular mapping of soybean nodulation genes. *In*: GRESSHOFF PM, ed., Plant Genome Analysis. Current Topics in Plant Molecular Biology, CRC Press, Boca Raton: 97-112
- HAGENDORFF G, HANES J, VON DER KAMMER H, SCHEIT KH (1995) A monoclonal antibody generated against a recombinant peptide fragment of the B3 domain of carcinoembryonic antigen reacts with intact carcinoembryonic antigen. *Biochim Biophys Acta* **1260**: 259-268
- HAMDAN I & DIPOH J (1991) Purification and physicochemical properties of starch phosphorylase from yam (*Dioscorea cayenensis*). *Plant Sci* **76**: 1-7
- HANAHAHAN D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580

- HART GE (1983) Genetics and evolution of multilocus isozymes in hexaploid wheat. *Isozymes Curr Top Biol Med Res* **10**: 365-380
- HAY B & SHORT JM (1992) *Stratagies* **5**: 16
- HEINONEN JK & LAHTI RJ (1981) A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Analytical Biochem* **113**: 313-317
- HENKER A, SCHINDLER I, RENZ A, BECK E (1998) Protein heterogeneity of spinach pullulanase results from the coexistence of interconvertible isomeric forms of the monomeric enzyme. *Biochem J* **331**: 929-935
- HEUKESHOVEN J & DERNICK R (1985) Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* **6**: 103-112
- HEYER AG, LLOYD JR, KOßMANN J (1999) Production of modified polymeric carbohydrates. *Curr Op Biotech* **10**: 169-174
- HOLMES DS & QUIGLEY M (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem* **114**: 193-197
- HUDSON JW, GOLDING GB, CRERAR MM (1993) Evolution of allosteric control in glycogen phosphorylase. *J Mol Biol* **234**: 700-721
- HWANG PK & FLETTERICK RJ (1986) Convergent and divergent evolution of regulatory sites in eukaryotic phosphorylases. *Nature* **324**: 80-84
- IBELGAUFTS H (1990): *Gentechnologie von A bis Z*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- JAMES MG, ROBERTSON DS, MYERS AM (1995) Characterization of the maize gene *sugary1*, a determinant of starch composition in kernels. *Plant Cell* **7**: 417-429
- JENKINS JA, JOHNSON LN, STUART DI, STURA EA, WILSON KS ZANOTTI G (1981): Phosphorylase: control and activity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **293**: 23-41.
- JENKINS PJ, CAMERON RE, DONALD AM (1993) A universal feature in the structure of starch granules from different botanical sources. *Starch* **45**: 417-420
- KAINUMA K (1988) Structure and chemistry of the starch granule. *The Biochemistry of Plants*, Vol. **14**: 141-180
- KHANNA SK, KRISHNAN PS, SANWAL GG (1971) Glucan phosphorylase in the leaves of *Dendrophthoe falcata*: purification and characterization of enzyme. *Phytochemistry* **10**: 551-559
- KHYSE-ANDERSEN J (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**: 203-209
- KNOCH K & KEPHART D (1999) Cloning blunt-end *Pfu* DNA polymerase-generated PCR fragments into pGEM®-T vector systems. *Promega Notes* **71**, 10
- KOOLMAN J, RÖHM K-H (1994) *Taschenatlas der Biochemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- KOßMANN J, VISSER RGF, MÜLLER-RÖBER B, WILLMITZER L, SONNEWALD U (1991) Cloning and expression analysis of a potato cDNA that encodes branching en-

- zyme: Evidence for co-expression of starch biosynthetic genes. *Mol Gen Genet* **230**: 39-44
- KRUGER NJ & AP REES T (1983) Properties of α -glucan phosphorylase from pea chloroplasts. *Phytochemistry* **22**: 1891-1898.
- KUMAR A & SANWAL GG (1982) Purification and physicochemical properties of starch phosphorylase from young banana leaves. *Biochemistry* **21**: 4152-4159
- LAEMMLI UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- LI Z, CHU X, MOUILLE G, YAN L, KOSAR-HASHEMI B, HEY S, NAPIER J, SHEWRY P, CLARKE B, APPELS R, MORELL MK, RAHMAN S (1999) The localization and expression of the class II starch synthases of wheat. *Plant Physiol* **120**: 1147-1155
- LI Z, MOUILLE G, KOSAR-HASHEMI B, RAHMAN S, CLARKE B, GALE KR, APPELS R, MORELL MK (2000) The structure and expression of the wheat starch synthase III gene. Motifs in the expressed gene define the lineage of the starch synthase III gene family. *Plant Physiol* **123**: 613-624
- LIN C-T, YEH K-W, LEE P-D, SU J-C (1991) Primary structure of sweet potato starch phosphorylase deduced from its cDNA sequence. *Plant Physiol* **95**: 1250-1253
- LIN C-T, LIN M-T, CHOU H-Y, LEE P-D, SU J-C (1995) The gene structure of starch phosphorylase from sweet potato. *Plant Physiol* **107**: 277-278
- LUDWIG I, ZIEGLER P, BECK E (1984) Purification and properties of spinach leaf debranching enzyme. *Plant Physiol* **74**: 856-861
- MANGAT BS & BADENHUIZEN NP (1971) Studies on the origin of amylose and amylopectin in starch granules. III. The effect of temperature on enzyme activities and amylose content. *Can J Biol* **49**: 1787-1792
- MARTIN C & SMITH AM (1995) Starch biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 971-985
- MATHESON NK & RICHARDSON RH (1976) Starch phosphorylase enzymes in developing and germinating pea seeds. *Phytochemistry* **15**: 887-892
- MATHESON NK & RICHARDSON RH (1978) Kinetic properties of two starch phosphorylases from pea seeds. *Phytochemistry* **17**: 195-200
- MATEYKA C & SCHNARRENBERGER C (1988) Purification and properties of mesophyll and bundle sheath cell α -glucan phosphorylases from *Zea mays* L. *Plant Physiol* **86**: 417-422
- MEAD DA, PEY NK, HERRNSTADT C, MARCIL RA, SMITH LM (1991) A universal method for the direct cloning of PCR amplified nucleic acid. *Bio/Technology* **9**: 657-663
- MORELL MK, BLENNOW A, KOSAR-HASHEMI B, SAMUEL MS (1997) Differential expression and properties of starch branching enzyme isoforms in developing wheat endosperm. *Plant Physiol* **113**: 201-208
- MORRELL S & AP REES T (1986) Control of the hexose content of potato tubers. *Phytochemistry* **25**: 1073-1076
- MORI H, TANIZAWA K, FUKUI T (1991) Potato tuber type H phosphorylase isozyme. *J Biol Chem* **266**: 18446-18453
- MORI H, TANIZAWA K, FUKUI T (1993) A chimeric α -glucan phosphorylase of plant type L and H isozymes. *J Biol Chem* **268**: 5574-5581

- MOSI R & WITHERS SG (1999) Synthesis and kinetic evaluation of 4-deoxy-maltopentaose and 4-deoxymaltohexaose as inhibitors of muscle and potato α -glucan phosphorylases. *Biochem J* **338**: 251-256
- MOUILLE G, MADDELEIN M-L, LIBESSART N, TALAGA P, DECQ A, DELRUE B, BALL S (1996) Preamylopectin processing: A mandatory step for starch biosynthesis in plants. *Plant Cell* **8**: 1353-1366
- MU HH, YU Y, WASSERMAN BP, CARMAN GM (2001) Purification and characterization of the maize amyloplast stromal 112-kDa starch phosphorylase. *Arch Biochem Biophys* **388**: 155-164
- MÜLLER-RÖBER BT, KOßMANN J (1994) Approaches to influence starch quantity and starch quality in transgenic plants. *Plant Cell Environ* **17**: 601-613
- MÜLLER-RÖBER BT, KOßMANN J, HANNAH LC, WILLMITZER L, SONNEWALD U (1990) One of two different ADP-glucose pyrophosphorylase genes from potato responds strongly to elevated levels of sucrose. *Mol Gen Genet* **224**: 136-146
- MURAI J, TAIRA T, OHTA D (1999) Isolation and characterization of the three *Waxy* genes encoding the granule-bound starch synthase in hexaploid wheat. *Gene* **234**: 71-79
- MYERS AM, MORELL MK, JAMES MG, BALL SG (2000) Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiol* **122**: 989-997
- NAIR RB, BAGA M, SCOLES GJ, KARTHA KK, CHIBBAR RN (1997) Isolation, characterization and expression analysis of a starch branching enzyme II cDNA from wheat. *Plant Sci* **122**: 153-163
- NAKAMURA Y & IMAMURA M (1983) Characterization of *Chlorella* phosphorylase: The glucan specificity and effect of temperature. *Phytochemistry* **22**: 2395-2399
- NAKAMURA Y, UMEMOTO T, TAKAHATA Y, KOMAE K, AMANO E, SATOH H (1996) Changes in structure of starch and enzyme activities affected by *sugary* mutations in developing rice endosperm: Possible role of starch debranching enzyme (R-enzyme) in amylopectin synthesis. *Physiol Plant* **97**: 491-498
- NAKANO K & FUKUI T (1986) The complete amino acid sequence of potato α -glucan phosphorylase. *J Biol Chem* **261**: 8230-8236
- NARANAN V, BRICKEY DA, RUTHERFORD CL (1988) Glycogen phosphorylase „b“ in *Dictyostelium*: Stability and endogenous phosphorylation. *Mol Cell Biochem* **83**: 89-104
- OJA V, SAVCHENKO G, JAKOB B, HEBER U (1999) pH and buffer capacities of apoplastic and cytoplasmic cell compartments in leaves. *Planta* **209**: 239-249
- OKAMOTA K & AKAZAWA T (1978) Purification of α - and β -amylase from endosperm tissue of germinating rice seeds. *Agric Biol Chem* **42**: 1379-1384
- OKITA TW, GREENBERG E, KUHN DN, PREISS J (1979) Subcellular localization of the starch degradative and biosynthetic enzymes of spinach leaves. *Plant Physiol* **64**: 187-192
- OLUOHA U & UGOCHUKWU EN (1995) Comparison of structure and kinetic mechanism of phosphorylase forms isolated from water yam (*Dioscorea alata*) and white yam (*Dioscorea rotundata*) tubers. *Phytochemistry* **40**: 677-684

- OZBUN JL, HAWKER JS, PREISS J (1971) Adenosine diphosphoglucose-starch glucosyl transferases from developing kernels of waxy maize. *Plant Physiol* **78**: 765-769
- PALM D, GOERL R, BURGER KJ (1985) Evolution of catalytic and regulatory sites in phosphorylases. *Nature* **313**: 500-502
- PALM D, KLEIN HW, SCHINZEL R, BUEHNER M, HELMREICH EJM (1990) The role of pyridoxal 5'-phosphate in glycogen phosphorylase catalysis. *Biochemistry* **29**: 1099-1106
- PAUL MJ, LOOS K, STITT M, ZIEGLER P (1993) Starch-degrading enzymes during the induction of CAM in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Cell Environment* **16**: 531-538
- PEDERSEN AG & NIELSEN H (1997) Neural network prediction of translation initiation sites in eukaryotes: Perspectives for EST and genome analysis. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **5**: 226-233
- PONGRATZ P & BECK E (1978) Diurnal oscillation of amylolytic activity in spinach chloroplasts. *Plant Physiol* **62**: 687-689
- PREISS J & LEVI C (1980) Starch biosynthesis and degradation. *Biochemistry of Plants*, Vol. **3**: 371-423
- PREISS J, OKITA TW, GREENBERG E (1980) Characterization of the spinach leaf phosphorylases. *Plant Physiol* **66**: 864-869
- PREISS J (1982) Regulation of the biosynthesis and degradation of starch. *Ann Rev Plant Physiol* **33**: 431-454
- PREISS J (1988) Biosynthesis of starch and its regulation. *Biochemistry of Plants*, Vol. **14**: 181-254
- PROUDFOOT N (1984) The end of the message and beyond. *Nature* **307**: 412-413
- RICHARDSON RH & MATHESON NK (1977) Some molecular properties of plant starch phosphorylases and the levels of activity of the multiple forms. *Phytochemistry* **16**: 1875-1879
- RYAN CA (1987) Oligosaccharide signalling in plants. *Ann Rev Cell Biol* **3**: 295-317
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- SCHÄCHTELE C & STEUP M (1986) α -1,4-Glucan phosphorylase forms from leaves of spinach (*Spinacia oleracea* L.). I. In situ localization by indirect immunofluorescence. *Planta* **167**: 444-451
- SCHÄCHTELE K-H, SCHILTZ E, PALM D (1978) Amino-acid sequence of the pyridoxal-phosphate-binding site in *Escherichia coli* maltodextrin phosphorylase. *Eur J Biochem* **92**: 427-435
- SCHÄGGER H & VON JAGOW G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**: 368-379
- SCHILTZ E, PALM D, KLEIN HW (1980) N-terminal sequences of *Escherichia coli* and potato phosphorylase. *FEBS Letters* **109**: 59-62
- SCHINZEL R & NIDETZKY B (1999) Bacterial α -glucan phosphorylases. *FEMS Lett* **171**: 73-79

- SCHNEIDER EM, BECKER J-U, VOLKMANN D (1981) Biochemical properties of potato phosphorylase change with its intracellular localization as revealed by immunological methods. *Planta* **151**: 124-134
- SCHUPP N (1997) Weizenblatt-Phosphorylasen: Isolierung, Charakterisierung und Hemmung durch β -Amylase. Diplomarbeit, Universität Bayreuth
- SHATTERS RG & WEST SH (1995) Response of *Digitaria decumbens* leaf carbohydrate levels and glucan degrading enzymes to chilling night temperature. *Crop Sci* **35**: 516-523
- SHATTERS RG & WEST SH (1996) Purification and characterization of non-chloroplastic α -1,4-glucan phosphorylases from leaves of *Digitaria eriantha* Stent. *J Plant Physiol* **149**: 501-509
- SHIMOMURA S & FUKUI T (1980) A comparative study on α -glucan phosphorylases from plant and animal: Interrelationship between the polysaccharide and pyridoxal phosphate binding sites by affinity electrophoresis. *Biochemistry* **19**: 2287-2294
- SHIMOMURA S, NAGAI M, FUKUI T (1982) Comparative glucan specificities of two types of spinach leaf phosphorylase. *J Biochem* **91**: 703-717
- SHOEMAKER RC, LORENZEN LL, DIERS BW, OLSON TC (1994) Genome mapping and agriculture. In: GRESSHOFF PM, ed., *Plant Genome Analysis. Current Topics in Plant Molecular Biology*, CRC Press, Boca Raton: 1-10
- SHORT JM, FERNANDEZ JM, SORGE JA, HUSE WD (1988) λ -ZAP: A bacteriophage lambda expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucl Acids Res* **16**: 7583-7600
- SINGH S & SANWAL GG (1975) Characterization of multiple forms of α -glucan phosphorylase from *Musa paradisiaca* fruits. *Phytochemistry* **14**: 113-118
- SINGH S & SANWAL GG (1976) Multiple forms of α -glucan phosphorylase in banana fruits: Properties and kinetics. *Phytochemistry* **15**: 1447-1451
- SLATTERY CJ, KAVAKLI IH, OKITA TW (2000) Engineering starch for increased quantity and quality. *TIPS* **5**: 291-298
- SMITH A (1999) Making starch. *Curr Op Plant Biol* **2**: 223-229
- SMYTHE C & COHEN P (1991) The discovery of glycogenin and the priming mechanism for glycogen biogenesis. *Eur J Biochem* **200**: 625-631
- SONNEWALD U, BASNER A, GREVE B, STEUP M (1995) A second L-type isozyme of potato glucan phosphorylase: Cloning, antisense inhibition and expression analysis. *Plant Mol Biol* **27**: 567-576
- SRIVASTAVA S, NIGHOJKAR A, KUMAR A (1995) Purification and characterization of starch phosphorylase from *Cuscuta reflexa* filaments. *Phytochemistry* **39**: 1001-1005
- STEUP M & LATZKO E (1979) Intracellular localization of phosphorylases in spinach and pea leaves. *Planta* **146**: 69-75
- STEUP M, SCHÄCHTELE C, LATZKO E (1980) Purification of a non-chloroplastic α -glucan phosphorylase from spinach leaves. *Planta* **148**: 168-173

- STEUP M (1981) Purification of chloroplast α -1,4-glucan phosphorylase from spinach leaves by chromatography on sepharose-bound starch. *Biochim Biophys Acta* **659**: 123-131
- STEUP M & SCHÄCHTELE C (1981) Mode of glucan degradation by purified phosphorylase forms from spinach leaves. *Planta* **153**: 351-361
- STEUP M, ROBENEK H, MELKONIAN M (1983) In-vitro degradation of starch granules isolated from spinach chloroplasts. *Planta* **158**: 428-436
- STEUP M & SCHÄCHTELE C (1986) α -1,4-glucan phosphorylase forms from leaves of spinach (*Spinacia oleracea* L.). II. Peptide patterns and immunological properties. A comparison with other phosphorylase forms. *Planta* **168**: 222-231
- STEUP M (1988) Starch degradation. *The Biochemistry of Plants*, Vol. **14**: 255-296
- STEUP M (1990) Starch degrading enzymes. *In: Methods in plant biochemistry*. Vol. 3. LEA PF, ed. Academic Press Limited, London: 103-128
- STEUP M, YANG Y, GREVE B, WEILER EW (1991) Characterization of a heteroglucan from higher plants. *In: BONNEMAIN JL, DELROT S, LUCAS WJ, DAINY J*, eds. Recent advances in phloem transport and assimilate compartmentation. Ouest Editions, Nantes: 224-232
- STITT M (1984) Degradation of starch in chloroplasts: A buffer to sucrose metabolism. *In: Storage carbohydrates in vascular plants*. LEWIS DH, ed. Cambridge University Press, Cambridge: 205-229
- ST-PIERRE B & BRISSON N (1995a) Induction of the plastidic starch-phosphorylase gene in potato sink tissue. *Planta* **195**: 339-344
- ST-PIERRE B & BRISSON N (1995b) 5'-deletion analysis of the potato starch phosphorylase gene: An upstream sequence defines distal regulatory elements and a proximal organ-dependent promoter. *Plant Sci* **110**: 193-203
- STÜBER D, MATILE H, GAROTTA G (1990) System for high-level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function analysis. *In: Immunological Methods*. Lefkovits I & Pernis B, eds., Vol IV, Academic Press, New York: 121-152
- SUN Z & HENSON CA (1990) Degradation of native starch granules by barley α -glucosidases. *Plant Physiol* **94**: 320-327
- TAKAHA T, CRITCHLEY J, OKADA S, SMITH SM (1998) Normal starch content and composition in tubers of antisense potato plants lacking D-enzyme (4- α -glucanotransferase). *Planta* **205**: 445-451
- TAKATA H, TAKAHA T, OKADA S, TAKAGI M, IMANAKA T (1997) Characterization of a gene cluster for glycogen biosynthesis and a heterotetrameric ADP-glucose pyrophosphorylase from *Bacillus stearothermophilus*. *J Bacteriol* **179**: 4689-4698
- TAKUMI S, KOSUGI T, MURAI K, MORI N, NAKAMURA C (2000) Molecular cloning of three homoeologous cDNAs encoding orthologs of the maize KNOTTED1 homoeobox protein from young spikes of hexaploid wheat. *Gene* **249**: 171-181
- TANDECARZ JS, SIVAK MN, CARDINI CE (1978) A primer independent form of potato tuber phosphorylase. *Biochem Biophys Res Com* **82**: 157-164

- TETLOW IJ, BLISSETT KJ, EMES MJ (1993) A rapid method for the isolation of purified amyloplasts from wheat endosperm. *Planta* **189**: 597-600
- TETLOW IJ, BLISSETT KJ, EMES MJ (1998) Metabolite pools during starch synthesis and carbohydrate oxidation in amyloplasts isolated from wheat endosperm. *Planta* **204**: 100-108
- THOMAS BR & RODRIGUEZ RL (1994) Metabolite signals regulate gene expression and source/sink relations in cereal seedlings. *Plant Physiol* **106**: 1235-1239
- TSAI CY & NELSON OE (1968) Phosphorylases I and II of maize endosperm. *Plant Physiol* **43**: 103-112
- TSAI CY & NELSON OE (1969) Two additional phosphorylases in developing maize seeds. *Plant Physiol* **44**: 159-167
- UGALDE JE, LEPEK V, UTTARO A, ESTRELLA J, IGLESIAS A, UGALDE RA (1998) Gene organization and transcription analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* glycogen (glg) operon: Two transcripts for the single phosphoglucomutase gene. *J Bacteriol* **180**: 6557-6564
- VAN BERKEL J, CONRADS-STRAUCH J, STEUP M (1991) Glucan-phosphorylase forms in cotyledons of *Pisum sativum* L.: Localization, developmental change, in-vitro translation and processing. *Planta* **185**: 432-439
- VAN DE WAL M, D'HULST C, VINCKEN J-P, BULÉON A, VISSER R, BALL S (1998) Amylose is synthesized in vitro by extension of and cleavage from amylopectin. *J Biol Chem* **273**: 22232-22240
- VENKAIAH B & KUMAR A (1996) Multiple forms of starch phosphorylase from *Sorghum* leaves. *Phytochemistry* **41**: 713-717
- VILLAREJO MR & ZABIN I (1974) Beta-galactosidase from termination and deletion mutant strains. *J Bacteriol* **120**: 466-474
- VOET D & VOET JG (1992) Biochemie. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- VORNLOCHER H-P, SCHEIBLE W-R, FAULHAMMER HG, SPRINZL M (1997) Identification and purification of translation initiation factor 2 (IF2) from *Thermus thermophilus*. *Eur J Biochem* **243**: 66-71
- VRETBLAD P (1974) Immobilization of ligands for biospecific affinity chromatography via their hydroxyl groups. The cyclohexaamylose- β -amylase system. *FEBS Lett* **47**: 86-89
- VRINTEN PL & NAKAMURA T (2000) Wheat granule-bound starch synthase I and II are encoded by separate genes that are expressed in different tissues. *Plant Physiol* **122**: 255-263
- WAGNER G (1999) Molekularbiologische und proteinchemische Untersuchungen zum Polymorphismus der β -Amylase aus Weizenblättern. Dissertation, Universität Bayreuth
- WARBURG O & CHRISTIAN W (1942) Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochemische Zeitschrift* **310**: 384-421
- WARNER N & RUTHERFORD CL (2000) Purification and cloning of TF2: A novel protein that binds a regulatory site of the *gp2* promoter in *Dictyostelium*. *Arch Biochem Biophys* **373**: 462-470

- WATSON KA, MCCLEVERTY C, GEREMIA S, COTTAZ S, DRIGUEZ H, JOHNSON LN (1999) Phosphorylase recognition and phosphorolysis of its oligosaccharide substrate: answers to a long outstanding question. *EMBO J* **18**: 4619-4632
- WEINER MP, ANDERSON C, JERPSETH B, WELLS S, JOHNSON-BROWNE B, VAILLANCOURT P (1994) *Strategies* **7**: 41-43
- WESELAKE RJ & HILL RD (1982) Cycloheptaamylose as an affinity ligand of cereal alpha amylase. Characteristics and a possible mechanism of the interaction. *Carbohydr Res* **108**: 153-161
- WESTERMEIER R (1990) *Elektrophorese-Praktikum*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- WITT W & SAUTER JJ (1995a) Partial purification of amylases and starch phosphorylases from poplar wood. *J Plant Physiol* **146**: 15-21
- WITT W & SAUTER JJ (1995b) *In vitro* degradation of starch grains by phosphorylases and amylases from poplar wood. *J Plant Physiol* **146**: 35-40
- WU J, GAGE DA, WATSON JT (1996) A strategy to locate cysteine residues in proteins by specific chemical cleavage followed by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Anal Biochem* **235**: 161-174
- YANG H, LIU MY, ROMEO T (1996) Coordinate genetic regulation of glycogen catabolism and biosynthesis in *Escherichia coli* via the CsrA gene product. *J Bacteriol* **178**: 1012-1017
- YANG Y & STEUP M (1990) Polysaccharide fraction from higher plants which strongly interacts with the cytosolic phosphorylase isozyme. *Plant Physiol*: 960-969
- YU S, GÓMEZ-PINCHETTI J-L, EK B, GARCIA-REINA G, PEDERSÉN M (1993) Subcellular immuno-localization, amino acid composition and partial amino acid sequences of α -1,4-glucan phosphorylase of *Gracilaria* spp (Rhodophyta). *Physiol Plant* **89**: 11-20
- YU Y, MU H, WASSERMAN BP, CARMAN GM (2001) Identification of the maize amyloplast stromal 112-kD protein as a plastidic starch phosphorylase. *Plant Physiol* **125**: 351-359
- ZEEMAN SC, UMEMOTO T, LUE W-L, AU-YEUNG P, MARTIN C, SMITH AM, CHEN J (1998) A mutant of arabidopsis lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and phyto glycogen. *Plant Cell* **10**: 1699-1711
- ZEMANOVÁ L, PETER-KATALINIC J, KÖNIG S, WAGNER G, ZIEGLER P (2002) Post-translational N- and C-terminal processing in the development of wheat leaf β -amylase polymorphism from an hitherto undetected primary gene product. *Plant Physiol Biochem* **40**: 101-109
- ZIEGLER P (1995) Carbohydrate degradation during germination. *In*: Seed development and germination. KIGEL J & GALILI G, eds. Marcel Dekker, Inc. New York: 447-474
- ZIEGLER P, LOOS K, WAGNER G (1997) Posttranslational origin of wheat leaf β -amylase polymorphism. *J Plant Physiol* **150**: 537-545

VIII ANHANG

VIII.1 HETEROLOGE EXPRESSION DER CYTOSOLISCHEN PHOSPHORYLASE

cb wurde in einen Expressionsvektor kloniert, um die cytosolische Phosphorylase in *E. coli* heterolog zu exprimieren. Falls die Überexpression ein funktionelles Protein liefert, können seine Eigenschaften mit denen der aus der Pflanze isolierten Phosphorylase verglichen werden. Bei einer hohen Produktionsrate und erfolgreicher Isolierung des Proteins aus den Bakterienzellen könnte in fernerer Zukunft versucht werden, die heterolog exprimierte cytosolische Phosphorylase möglicherweise zu kristallisieren und ihre Röntgenstruktur zu ermitteln.

Als Expressionsvektor für *E. coli* wurde das Plasmid pQE30 (Qiagen) gewählt. Es enthält als Selektionsmarker das Gen für Ampicillinresistenz. Die Transkription der cDNA steht unter der Kontrolle des T5-Promotors. Die Expression wird durch die Zugabe von IPTG zu der Bakterienkultur induziert. Zur vereinfachten Reinigung des produzierten Proteins wurde es am N-Terminus mit einem His-Tag, bestehend aus sechs aufeinanderfolgenden Histidinen, versehen. Dieser ermöglicht die Affinitätsreinigung des Produktes an einer Nickelchelatsäule.

Für die Klonierung in pQE30 stehen folgende Restriktionsschnittstellen zur Verfügung: BamHI, SphI, SacI, KpnI, SmaI, XmaI, SalI, PstI und HindIII. *cb* wurde in einer PCR mit den zwei Schnittstellen SphI und SalI versehen, die in der Sequenz selbst nicht vorkommen. Hierzu dienten die Primer Pcyt_start_Sph1 und Pcyt_stop_Sal1 (vgl. Tabelle 3). Der Primer Pcyt_start_Sph1 enthält darüber hinaus eine Faktor Xa-Schnittstelle. Mit dieser kann nach Reinigung des heterolog exprimierten Proteins der His-Tag abgespalten werden. Zwei verschiedene Schnittstellen zur Einklonierung der cDNA wurden gewählt, damit das Gen nur in einer Richtung in den Vektor inserieren kann. Dies vereinfacht die Selektion geeigneter Klone. Vektor und PCR-Amplifikat wurden mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten und ligiert. Als Startcodon wurde das vermutliche Initiationscodon des Proteins, das ATG-Codon von Met49 gewählt.

E. coli M15-Zellen wurden mit dem Vektor-KV-Konstrukt transformiert. Nach Induktion der Zellen mit IPTG ließ sich jedoch kein Produkt der erwarteten Größe von 95 kD entdecken. In Abbildung 30 ist zu sehen, dass zusätzlich zu der Bildung einer schwachen Bande um 110 kD eine stärkere Bande bei ca. 55 kD produziert wurde. Bei allen untersuchten Klonen wurden neben einem Produkt um 110 kD verstärkt kleinere Peptide gebildet.

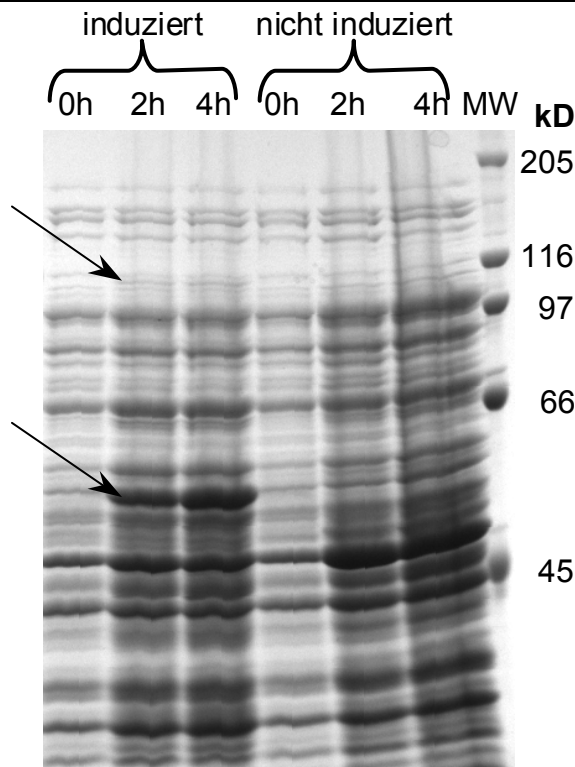


Abbildung 30: Überexpression der cytosolischen Phosphorylase in *E. coli* M15-Zellen

Aufgetragen wurden auf ein 12,5 %iges SDS-Gel Extrakte von *E. coli*-Zellen 0, 2 und 4 Stunden nach Induktion mit IPTG und als Kontrolle Zellproben der gleichen Zeitpunkte ohne Induktion mit IPTG (vgl. II.2.4.1.3). Die Pfeile kennzeichnen Überexpressionsprodukte. MW bezeichnet den Molekulargewichtsmarker SDS-6H (Sigma)

Eine genauere Analyse der Gensequenz von *cb* ergab, dass 21 der 42 Arginine durch die Codons AGA/AGG codiert wurden, für die es in herkömmlichen *E. coli*-Stämmen nicht genügend tRNA-Moleküle gibt. Durch diesen Mangel kommt es zu vorzeitigem Abbruch der Translation und dies bevorzugt an Stellen der mRNA, an denen Sekundärstrukturen ausgebildet werden (CARSTENS & WAESCHE 1999).

Aufgrund dieser Erkenntnis wurde der Vektor mit dem Phosphorylasegen in den Bakterienstamm *E. coli* BL21-CodonPlus™ (DE3)-RIL transformiert, welcher auf einem Plasmid zusätzliche Kopien der Gene für tRNAs trägt, die die Arginin-Codons AGA und AGG erkennen, sowie das Isoleucin-Codon AUA und das Leucin-Codon CUA. Mit Hilfe der Kolonieblot-Methode (s. II.2.6.3) wurden Klone gesucht, die das Protein stark exprimierten. Hierzu wurde ein Antikörper gegen 5xHis benutzt, der den exprimierten His-Tag nach Blotten der Bakterien auf eine Nylon-Membran erkennt (s. II.2.6.3). Nach Induktion mit IPTG bildeten die ausgesuchten Klone dieses *E. coli*-Stammes tatsächlich nur ein Protein um 110 kD.

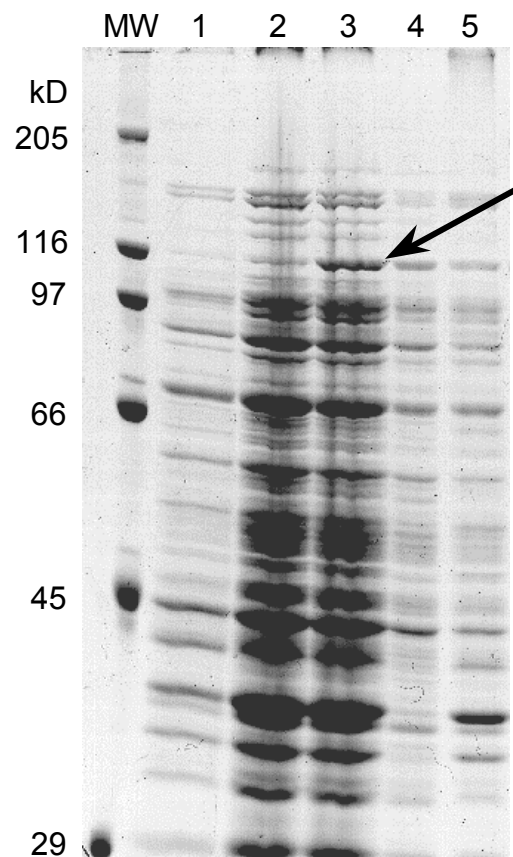


Abbildung 31: Überexpression der cytosolischen Phosphorylase in *E. coli* BL21-CodonPlus™-Zellen

Aufgetragen wurden auf ein 12,5 %iges SDS-Gel Extrakte von *E. coli*-Zellen (vgl. II.2.4.1.3) nach 0 Stunden (Bahn 1), 4 Stunden ohne Induktion (Bahn 2) und 4 Stunden nach Induktion mit IPTG (Bahn 3). Außerdem wurden der Überstand (Bahn 4) und der Niederschlag nach nicht-denaturierender Extraktion aufgetragen (II.2.4.1.3). Der Pfeil kennzeichnet das Überexpressionsprodukt. **MW** bezeichnet den Molekulargewichtsmarker SDS-6H (Sigma)

Das Protein befand sich sowohl in der löslichen Fraktion nach nicht-denaturierender Extraktion der *E. coli*-Zellen, als auch im Niederschlag der abzentrifugierten Zellfragmente. Vergleicht man Bahn 4 und Bahn 5 in der Abbildung 31, so ist zu sehen, dass sich ein grösserer Teil des Proteins in der löslichen Fraktion des Zellaufschlusses befindet. Wurde dieser Proteinextrakt über eine Nickelsäule filtriert, so band das überexprimierte Protein nicht an die Säule und war im Filtrat zu finden. In keiner Fraktion der Extraktion oder der Nickel-Chromatographie konnte Phosphorylaseaktivität nachgewiesen werden. Unter der Annahme, dass der His-Tag sich möglicherweise nicht an der Oberfläche des Proteins befindet, wurden die Zellen mit dem überexprimierten Protein unter denaturierenden Bedingungen aufgeschlossen. Aber auch von diesem Proteinextrakt band nur wenig Protein an die Nickelsäule.

VIII.2 PHOSPHORYLASESEQUENZEN AUS WEIZEN VAR. STAR

```

1  GGTAAATCCCCACCCGGAAGGATATGGAGGGAAAGATCGAATCGATGAGGGTTTGTAGATAACAATCCCCAGAAGCCAGT
  V I P T R K D M E G K I E S M R V L D N N P Q K P V 26
79  AGTGC GGATGGCGAATTTGTGTGTTGTGGCTGGGCATACGGTGAATGGAGTGGCCGAGTTGCACAGCAACATCTTGAA
  V R M A N L C V V A G H T V N G V A E L H S N I L K 52
157  ACAAGAGCTGTTTGCAGATTATGTCTCTATTTGGCCTAACAAATTCAGAACAAAACATAATGGAATTACACCACGTAG
  Q E L F A D Y V S I W P N K F Q N K T N G I T P R R 78
235  ATGGCTCCGTTTGTGCAACCCCGAGCTGAGTGAAATAGTCACGAAATGGTTAAAAACAGATCAGTGGACAAGCAACCT
  W L R F C N P E L S E I V T K W L K T D Q W T S N L 104
313  TGATCTTCTCACCGGGCTTCGGAATTCGCGAGATGATGAAAACTACATGCTGAGTGGGCAGCAGCCAAGCTGGCCAG
  D L L T G L R K F A D D E K L H A E W A A A K L A S 130
391  CAAAAAGCGCTTAGCCAAGCATGTGTTGGATGTGACTGGTGTACAAATTGATCCGAATAACCTTTTCGATATACAAAT
  K K R L A K H V L D V T G V T I D P N N L F D I Q I 156
469  TAAACGCATCCACGAATACAAGAGACAGCTGTTGAACATTTTGGGAGCTGTGTACAGATATAAGAAGTTAAAGGAAAT
  K R I H E Y K R Q L L N I L G A V Y R Y K K L K E M 182
547  GAGCGCAGAAGAGAGGAAGAAGGTTACACCACGCACTGTCATGGTAGGAGGGAAAGCATTGCAACATACACCAATGC
  S A E E R K K V T P R T V M V G G K A F A T Y T N A 208
625  TAAAGAATAGTGAAATTTGGTAAATGATGTTGGTGCTGTGGTGAACAATGATGCTGATGTCAACCAATATCTGAAGGT
  K R I V K L V N D V G A V V N N D A D V N Q Y L K V 234
703  GGTGTTTCATCCAACTACAACGTATCAGTGGCTGAAGTCTCATTCCTGGCAGTGAACGTGCACAGCACATTAGTAC
  V F I P N Y N V S V A E V L I P G S E L S Q H I S T 260
781  TGCAGGCATGTAAGCAAGTGAACAAGTAACATGAAGTTCTCTCTGAATGGCTGTGTTATCATTGGAACCTCTGGATGG
  A G M E A S G T S N M K F S L N G C V I I G T L D G 286
859  AGCCAATGTTGAAATCAGAGAAGAAGTAGGGCAAGACAACCTTCTTCCTTTTCGGTGCCAAAGCAGATCAGATTGCTGG
  A N V E I R E E V G Q D N F F L F G A K A D Q I A G 312
937  TCTGAGGAAGGAAAGGGAAGATGGCTTGTTCAGCCAGACCCACGCTTGAAGAAGCCAAACAGTTTATCAGGAGTG
  L R K E R E D G L F K P D P R F E E A K Q F I R S G 338
1015  TGCTTTCGGCACCTACGACTACACTCCTCTCTGGATTCCCTTGAAGGGAACACTGGATTGCGGCGTGGTGACTACTT
  A F G T Y D Y T P L L D S L E G N T G F G R G D Y F 364
1093  CCTTGTGGCTATGACTTCCCAAGCTACATTGACGCACAGGCCCGGTTGATGAAGCCTACAAGGACAAGAAGAAATG
  L V G Y D F P S Y I D A Q A R V D E A Y K D K K K W 390
1171  GATCAAGATGTCCATCTTGAACACGGCTGGAAGCGGCAAGTTCAGCAGCGACCGCACCATCGACCAATATGCGAAGGA
  I K M S I L N T A G S G K F S S D R T I D Q Y A K E 416
1249  GATCTGGGGCATTTCCGGCTTGCCCTGTTCCATGAagaggagacgtgatcaagaggtgazggatgatgatgcgtggcag
  I W G I S A C P V P * 442
1327  taataaggaccttatactgggtccatgggtgaataacccctgcttccgttgtagctgagaagaatgaagcaacgtacgaa
1405  gcctgttggtgtgtgtattctgctgcacttttgaagtgcataaggatgacgacttttctttgttcttttcttttctttt
1483  ggtctgtaaccatactattttgatcctgaaccggaatggcggaatcatccaggttctcaataaaatagttcaagtttt
1561  gaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagtactctgcgtgttaccactgcttgccctatagtgagtcgtattag 1637

```

Abbildung 32: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des 3'-RACE-Fragments der cytosolischen Phosphorylase *ck1* aus Weizenkörnern.

Die Nukleotide sind links, die Aminosäuren rechts nummeriert. Die Aminosäuren des codierenden Bereichs sind mit Großbuchstaben angegeben, genauso die codierenden Nukleotide. Der Kasten umrahmt das Pyridoxalphosphat-Bindungsmotiv. * steht für ein Stoppcodon.

```

1  CTTCTGAAGCCCTGGAGAAGTGGAGCTTGGACATTATGCAGAACTTCTACCTCGACATGTTGAGATCATAGAAACA 26
   L P E A L E K W S L D I M Q K L L P R H V E I I E T
79  ATAGATGAGGAGCTGATGAACAACATCGTCTCAAAATATGGAACGGCAGATATTTCACTGTTAAACAGAAAGCTTAAA 52
   I D E E L M N N I V S K Y G T A D I S L L K Q K L K
157  GATATGAGGATCTTAGACAACGTTGATCTTCCAGCCTCTGTGGCTAAACTGTTGTTAAACAAAAATGAAAAAGGGG 78
   D M R I L D N V D L P A S V A K L F V K T K M K K G
235  AAGTTGCTTGTGAATCTTTGGAGTCTATTGCTGAAGCTGACGAGAAAACCTGAGCCAGAAGAAGAGGAAAACATTCTA 104
   K L L V E S L E S I A E A D E K T E P E E E E N I L
313  TCCGAGACAACAGAGAAGAAGGGCGAGTCTGACTCTGAAGAAGCTCCTGATGCAGAAAAGGAGGATCCTGAGTATGAG 130
   S E T T E K K G E S D S E E A P D A E K E D P E Y E
391  TTAGATCCATTTGCAAAATACGATCCTCAGTTACCTAGAGTTGTTGCAATGGCAAACCTCTGTGTTGTTGGTGGACAT 156
   L D P F A K Y D P Q L P R V V R M A N L C V V G G H
469  TCAGTTAATGTTGGCTGAGATTCACAGTGAATTTGTTAAGCAAGATGTGTTCAATAGCTTTTATGAGATGTGGCCT 182
   S V N G V A E I H S E I V K Q D V F N S F Y E M W P
547  ACTAAGTTCCAAAACAAAACAAACGAGTAACCTCCAGGCGTTGGATCCGGTTTGTAACTCTGAATTAAGTGAATC 208
   T K F Q N K T N G V T P R R W I R F C N P E L S A I
625  ATTTCAAAATGGATAGGCTCTGATGACTGGATTCTGAACACTGATAAACTTGACGAGCTGAAGAAGTTTGCTGATGAT 234
   I S K W I G S D D W I L N T D K L A G L K K F A D D
703  GAGGATCTGCAATCAGAATGGCGTACTGCTAAAAGGAATAACAAGATGAAAGTAGTTTCACTGATAAGAGATAAGACT 260
   E D L Q S E W R T A K R N N K M K V V S L I R D K T
781  GGATATGTGTCAGCCAGATGCGATGTTTGTGTGTCAGGTGAAAAGAATACATGAATATAAGCGGCAGCTGCTAAAT 286
   G Y V V S P D A M F D V Q V K R I H E Y K R Q L L N
859  ATCCTTGATCGTTTACCGGTACAAGAAGATAAGAAATGAGTGCAAAAGATAGAATAAAGAGCTTTGTTCCAAGG 312
   I L G I V Y R Y K K M K E M S A K D R I K S F V P R
937  GTATGCATATTTGGTGGGAAAGCTTTTGCCACTTATGTACAGGCAAGAGGATTGTGAAGTTTATCACAGATGTCGCA 338
   V C I F G G K A F A T Y V Q A K R I V K F I T D V A
1015  GCTACTGTAATATGATCCTGATATTTGGAGATTTACTGAAGTTGTATTTGTCCAGATTATAATGTTAGCGTTGCT 364
   A T V N Y D P D I G D L L K V V F V P D Y N V S V A
1093  GAGAAGCTCATTCCTGCCAGTGAATTTGTCTCAGCaTATCAGTACCCTGGAATGAGGCTAGTGGAAACGCAACATG 390
   E K L I P A S E L S Q H I S T A G M E A S G T S N M
1171  AAGTTTGCAATGAATCTTTGTATTCTTATTGGAACCTTTGGATGGTCCGAATGTGGAGATCAGAGAAGAGGTTGGAGAG 416
   K F A M N S C I L I G T L D G A N V E I R E E V G E
1249  GAGAAGCTTTTCTCTTTGGTGCACATGCACCTGAAATCGCTGGTTTGAGGCAAGAGAGGCTGAAGGAAAGTTTGTG 442
   E N F F L F G A H A P E I A G L R Q E R A E G K F V
1327  CCTGACCCGAGATTTGAAGAGGTTAAGGAATACGTCGCGAGTGGCGTCTTTGGGACTAGCAACTATGATGAATTGATG 468
   P D P R F E E V K E Y V R S G V F G T S N Y D E L M
1405  GGTTCCTTTGGAAGGAAATGAAGGTTATGGACGTGCAGATTATTTTCTTGTGGCAAGGATTTTCCAGTTACATTGAA 494
   G S L E G N E G Y G R A D Y F L V G K D F P S Y I E
1483  TGCCAGGAAAAAGTTGATGAAGCATACCGAGATCAGAAGCTATGGACAAGAATGTCTATCCTCAACACAGCGGGTTCC 520
   C Q E K V D E A Y R D Q K L W T R M S I L N T A G S
1561  CCCAAGTTTCAGCAGTGACCGGACGATCCACGAGTACGCCAAGGACATATGGGATATCAGCCCTGTATCATGCCTGA 546
   P K F S S D R T I H E Y A K D I W D I S P V I M P *
1639  ataattcaagcagcttcagggaaccttgagagtctatgaggcgagattggctgcagatttgacctcgattcagcgagaa
1717  tgtattgctccccccagttttgtataggcatatgcaagttctggcatggacctgagtgctgagagcatgcagggtagt
1795  tcatccttagcaatcttgcagtcagttggccagtataccaggcttatggtgtgtatttcgcgcaataaagttggag
1873  cagaatcatcaaacatactttggtgtatctgtaataataaagggtaaatgactgaacaaaaagtgctcggt
1951  ggcgcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagtactctgcgttggttaccactgcttgccctatagtgagtcgtatt
2029  ag 2030

```

Abbildung 33: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des 3'-RACE-Fragments der plastidischen Phosphorylase *pb2* aus Weizenblättern.

Die Nukleotide sind links, die Aminosäuren rechts nummeriert. Die Aminosäuren des codierenden Bereichs sind mit Großbuchstaben angegeben, genauso die codierenden Nukleotide. Die Insertregion ist fett gedruckt und unterstrichen. Der Kasten umrahmt das Pyridoxal-phosphat-Bindungsmotiv. * steht für ein Stoppcodon.

```

1  GCTTATTACCTATCCATGGAATTTTGCAGGGAAGAGCTCTTACAAATGCTATTGGCAACCTAGAGCTAACAGGACAA
  A Y Y L S M E F L Q G R A L T N A I G N L E L T G Q   26
79  TATGCGAAGCGTTAAAACAACTTGGACAGAACCTAGAGGATGTTGCTAGTCAGGAACCAGATCCCTGCCCTTGGCAAT
  Y A E A L K Q L G Q N L E D V A S Q E P D P A L G N   52
157 GGTGGACTAGGCCGTCTAGCGTCCTGTTTCTGGATTCTATGGCAACCCTAAATTATCCAGCATGGGGATATGGACTT
  G G L G R L A S C F L D S M A T L N Y P A W G Y G L   78
235 CGG   237
    R   79

```

Abbildung 34: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des 5'-RACE-Fragments der plastidischen Phosphorylase *pb3* aus Weizenblättern.
Die Nukleotide sind links, die Aminosäuren rechts nummeriert.

```

1  CTTCTGAAGCCCTGGAGAAGTGGAGCTTGGACATTATGCAGAACTTCTACCCGACATGTTGAGATCATAGAAACA
  L P E A L E K W S L D I M Q K L L P R H V E I I E T   26
79  ATAGATGAGAAGCTGATGAACAACATCGTCTCAAAATATGGAACGCAGATATTTCACTGTAAAAACAGAAGCTTAAA
  I D E K L M N N I V S K Y G T A D I S L L K Q K L K   52
157 GATATGAGGATCTTAGACAACGTTGATCTTCCAGCCTCTGTTGCTAAACTGTTTATTAACCTAAAGAGAAAACGGGG
  D M R I L D N V D L P A S V A K L F I K P K E K T G   78
235 AAGTTGCTTGTCAATCTTGGAGTCTATTGCTGAAGGTGACGAGAAAACTGAGTCACAAGAGGAGGAAAACITCTA
  K L L V Q S L E S I A E G D E K T E S Q E E N I L   104
313 TCCGAGACAGCAGAGAAAAAGGGCGGATCTGACTCTGAAGAAGCTCTGATGCAGAAAAGGAGGATCCTGTGTATGAG
  S E T A E K K G G S D S E E A P D A E K E D P V Y E   130
391 TTAGATCCATTGCAAAATACGATCCTCAGTTACCTAGAGTTGTTTGAATGGCAAATCTCTGTGTGTTGGTGGACAT
  L D P F A K Y D P Q L P R V V R M A N L C V V G G H   156
469 TCAGTTAATGGTGTGGCTGAGATTACAGTGAATTTGTAAGCAAGATGTGTCAATAGCTTTTATGAGATGTGGCCT
  S V N G V A E I H S E I V K Q D V F N S F Y E M W P   182
547 ACTAAGTTCCAAAACAAAACAAACGAGTAACCTCCAGCGGTTGGATCCGGTTTGTAACTCTGAATTAAGTGAATC
  T K F Q N K T N G V T P R R W I R F C N P E L S A I   208
625 ATTTCAAAATGGATAGGCTCTGATGACTGGATTCTGAACACTGATAAACTTGCAGGACTGAAGAAGTTTGTGTATGAT
  I S K W I G S D W I L N T D K L A G L K K F I T D D   234
703 GAGGATCTGCAATCAGAAATGGCGTACTGCTAAAGGAATAACAAGATGAAGGTAGTTTCGCTGATAAGAGACAAGACT
  E D L Q S E W R T A K R N N K M K V V S L I R D K T   260
781 GGATATGTTGTTCAGCCCAGATGCGATGTTTGTGTGTCAGGTGAAAAGAATACATGAATATAAGCGGCAGCTGCTAAAT
  G Y V V S P D A M F D V Q V K R I H E Y K R Q L L N   286
859 ATCCTTGGTATCGTTTACCAGATACAAGAAGATGAAAGAATGAGTGCCAAAGATAGAATAAAGAGCTTTGTTTCAAGG
  I L G I V Y R Y K K M K E M S A K D R I K S F V P R   312
937 GTATGCATATTTGGTGGGAAAGCTTTTGCCACTTACGTACAGGCAAAGAGGATGTGAAGTTTATCAGATGTCGCA
  V C I F G G K A F A T Y V Q A K R I V K F I T D V A   338
1015 GCTACTGTAAATTATGACCCTGATGTTGGAGATTTACTGAAGGTTGATTTGTCCAGATTATAATGTTAGCGTTGCT
  A T V N Y D P D V G D L L K V V F V P D Y N V S V A   364
1093 GAGAAGCTCATTCCTGCCAGTGAATGTCCCAGCATATCAGTACCCTGGAATGGAAGCTAGTGGAAACCAGCAACATG
  E K L I P A S E L S Q H I S T A G M E A S G T S N M   390
1171 AAGTTTGAATGAATGTTGTATTCTTATTGGAACCTTTGGATGGTGCAGATGTGGAGATCAGAGAAGAGGTTGGAGAG
  K F A M N S C I L I G T L D G A N V E I R E E V G E   416
1249 GAGAACTTTTCTCTTTGGTGCACATGCACCTGAAATCGCTGGTTTGAGGCAAGAGAGGGCTGAAGGAAAGTTTGTG
  E N F F L F G A H A P E I A G L R Q E R A E G K F V   442
1327 CCTGACCCGAGATTTGAAGAGGTTAAGGAATACGTCCGAGTGGCGTCTTTGGGACTAGCAACTATGATGAATTGATG
  P D P R F E E V K E Y V R S G V F G T S N Y D E L M   468
1405 GGTTCCTTTGGAAGGAAATGAAGGTTATGGACGTGCAGATTATTTCTTGTGGCAAGGATTTTCCAGTTACATTGAA
  G S L E G N E G Y G R A D Y F L V G K D F P S Y I E   494
1483 TGCCAGCAAAAAGTTGATGAAGCATACCGAGATCAGAAGCTATGGACAAGAATGTCTATCCTCAACACAGCGGGTTCC
  C Q Q K V D E A Y R D Q K L W T R M S I L N T A G S   520
1561 CCCAAGTTTCAGCAGTGACCGGACGATCCATGAGTACGCCAAGGACATATGGGATATCAGCCCCGTATCATGCCTGA
  P K F S S D R T I H E Y A K D I W D I S P V I M P *   546
1639 ataattcaagcagcttcaggaaccttgagagctatgagcgcgattggctcgcatattgacctcgattcagcgagaa
1717 tgcattgctccccccagttttgtataggcatatgcaagttctgacatggacctgagtgctgagagcatgcagggtag
1795 ttaatccttagcaatcttgctgtcagttggccagttattaccaggaattatgggtgtgtgtatttcgccaataaag   1870

```

Abbildung 35: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des 3'-RACE-Fragments der plastidischen Phosphorylase *pb3* aus Weizenblättern.

Die Nukleotide sind links, die Aminosäuren rechts nummeriert. Die Aminosäuren des codierenden Bereichs sind mit Großbuchstaben angegeben, genauso die codierenden Nukleotide. Die Insertregion ist fett gedruckt und unterstrichen. Der Kasten umrahmt das Pyridoxal-phosphat-Bindungsmotiv. * steht für ein Stoppcodon.

1	AATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAACAACGAGAGTACGCGGATGAATTGGAATGCAACATATGACTAT	
	N T T H Y R A S S G N N A E Y A G L N W N A T T Y D Y	26
79	TACAACAAAGTGAATGCAAAGCAAGCTTATTACCTATCCATGGAATTTTTCAGGGAAGAGCTCTTACAAATGCTATT	
	Y N K V N A K Q A Y Y L S M E F L Q G R A L T N A I	52
157	GGCAACCTAGAGCTAACAGGACAATATGCAGAAGCGTTAAAACAACTTGGACAGAACCTAGAGGATGTTGCTAGTCAG	
	G N L E L T G Q Y A E A L K Q L G Q N L E D V A S Q	78
235	GAACCAGATCCTGCCCTTGGCAATGGTGGACTAGGCCGTCTAGCGTCTGTTTCTGGATTCTATGGCAACCCTAAAT	
	E P D P A L G N G G L G R L A S C F L D S M A T L N	104
313	TATCCAGCATGGGATATGGACTTCGGTACAGATATGGCCTCTTTAAGCAAATCATAACAAAGGATGGTCAGGAGGAG	
	Y P A W G Y G L R Y R Y G L F K Q I I T K D G Q E E	130
391	GTAGCTGAGAATTGGCTAGAGATGGGAAATCCATGGGAGATTGTAAGAAATGATGTCTCTATCCTCTGAAATCTAT	
	V A E N W L E M G N P W E I V R N D V S Y P L K F Y	156
469	GGCAAAGTGGTTGAAGCACTGATGGGAGAAAACACTGGATTGGAGGAGAGAATATCAAGGCTGTGGCACATGATGTT	
	G K V V E G T D G R K H W I G G E N I K A V A H D V	182
547	CCTATTCTGGCTACAAGACTAAACTACTAATAATCTTCGTCTTTGGTCAACAACAGTA 606	
	P I P G Y K T K T T N N L R L W S T T V 202	

Abbildung 36: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des 5'-RACE-Fragments der plastidischen Phosphorylase *pk1* aus Weizenkörnern.

Die Nukleotide sind links, die Aminosäuren rechts nummeriert. Die Aminosäuren des codierenden Bereichs sind mit Großbuchstaben angegeben, genauso die codierenden Nukleotide.

1	GCTGAAGCTGACGAGAAAACTGAGTCAGAAGAGGAGGAAAAACATTCTATCCGAGACAACAGAGAAAAAGGGCGAATCT	
	A E A D E K T E S E E E E N I L S E T T E K K G E S	26
79	GACTCTGAAGAAGCTCCTGATGCAGAAAAGGAGGATCCTGAGTATGAGTTAGATCCATTTACAAAATACGATCCTCAG	
	D S E E A P D A E K E D P E Y E L D P F T K Y D P Q	52
157	TTACCTAGAGTGTGTTCAATGGCGAACCTCTGCGTTGTTGGTGGACATTCAAGTAAATGGTGTGGCTGAGATTACAGAT	
	L P R V V R M A N L C V V G G H S V N G V A E I H S	78
235	GAAATGTTAAGCAAGATGTGTTCAATAGCTTTATGAGATGTGGCTACTAAGTTCCAAAACAAAACAAATGGAGTG	
	E I V K Q D V F N S F Y E M W P T K F Q N K T N G V	104
313	ACCCCCAGGCGTTGGATCCGGTTTTGTAACTCTGAATTAAGTACAATAATTTCAAATGGATAGGCTCTGATGACTGG	
	T P R R W I R F C N P E L S T I I S K W I G S D D W	130
391	ATTCTGAACACTGATAAACTTGCAGGACTGAAGAAGTTTGTCTGATGATGAGGATCTGCAATCAGAATGGCGTACTGCT	
	I L N T K L A G K F A D D E D L Q S E W R T A	156
469	AAAAGGAATAACAAGATGAAGGTAGTTTCGCTGATAAGAGACAAGACTGGATATGTTGTGAGCCCGATGCAATGTTT	
	K R N N K M K V V S L I R D K T G Y V V S P D A M F	182
547	GATGTGCAGGTGAAAAGAATACATGAATATAAGCGGCAGCTTCTAAATATCCTTGGTATCATTTACCGCTACAGAAG	
	D V Q V K R I H E Y K R Q L L N I L G I I Y R Y K K	208
625	ATGAAAGAAATGAGTGCAAAAGATAGAATAAAGAGCTTTGTTCCAAGGGTATGCATATTTGGCGGGAAGCTTTTGCC	
	M K E M S A K D R I K S F V P R V C I F G G K A F A	234
703	ACTTACGTGCAGGCAAGAGGATTGTGAAGTTTATCACAGATGTGCGAGCTACTGTAAATATGATCCTGATATTGGA	
	T Y V Q A K R I V K F I T D V A A T V N Y D P D I G	260
781	GATCTACTGAAGGTTGTATTTGTCCAGATTATAATGTTAGCGTTGCTGAGACGCTCATTCTCGCCAGTGAATTGTCC	
	D L L K V F V P D Y N V S V A E T L I P A S	286
859	CAGCATATCAGTACCGCTGGAATG GAAGCTAGTGGAAACAGCAACATGAAGTTTGCAATGAATGGCTGTATTCTTATT	
	Q H I S T A G M E A S G T S N M K F A M N G C I L I	312
937	GGAACCTTTGGATGGTGGCAATGTGGAGATCAGAGAAGAGGTTGGAGAGGAGAACTTTTCTCTTTGGTGCACATGCA	
	G T L D G A N V E I R E E V G E E N F F L F G A H A	338
1015	CCTGAAATCGCTGGTTTGAGGCAAGAGAGCTGAAGGGAAGTTTGTGCTGACCCGAGATTTFGAGAGGTTAAGGAA	
	P E I A G L R Q E R A E G K F V P D P R F E E V K E	364
1093	TACGTCCGAGTGGCATCTTTGGGACTGGCAACTATGATGAATTGATGGGTCTTTTGGAGGAAATGAAGGTTATGGA	
	Y V R S G I F G T G N Y D E L M G S L E G N E G Y G	390
1171	CGTGCAGATTATTTTCTGTTGGCAAGGATTN'TCCAGTTACATTGAATGCCAGGAAAAAGTTGATGAAGCATACCGA	
	R A D Y F L V G K D F P S Y I E C Q E K V D E A Y R	416
1249	GATCAGAAGCTATGGACAAGAATGTCTATCTCAACACAGCGGGTTCCCCCAAGTTCAGCAGTGACCGGACGATCCAC	
	D Q K L W T R M S I L N T A G S P K F S S D R T I H	442
1327	GAGTATGCCAAGGACATATGGGGTATCAGCCCGTCATCATGCCCTGAataattcaagcagcttccaggaaccttgag	
	E Y A K D I W G I S P V I M P * 468	
1405	agtctatgaggcgcgattggtcgctgatttgcttgcattgattcagcgagaatgtattgctccccccagttttgtataggca	
1483	tatgcaagttctgacatggacctgagtgtgagagcatgcaggtagttcatccttagcaatattgcatgtcagtttag	
1561	ccagtattaccaggattatggtgtgtgtatttcgctgaataaagttaagacagagtcatacaacaacatactttgg	
1639	tgtatctgtaattgataaataaatggtacatgtgactgaacaaaaagtgtcgttgccgtgc 1698	

Abbildung 37: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des 3'-RACE-Fragments der plastidischen Phosphorylase *pk1* aus Weizenkörnern.

Die Nukleotide sind links, die Aminosäuren rechts nummeriert. Die Aminosäuren des codierenden Bereichs sind mit Großbuchstaben angegeben, genauso die codierenden Nukleotide. Die Insertregion ist fett gedruckt und unterstrichen. Der Kasten umrahmt das Pyridoxal-phosphat-Bindungsmotiv. * steht für ein Stoppcodon.

601

KV	TKWLKTDQWT	SNLDLLTGRL	KFADDEKLHA	EWAAAKLASK	KRLAKHVLDV	TGVTIDPDSL	FDIOIKRIHE	YKROLNMLG	AVRYKKLKE	MSAADR. QKV
CK1	TKWLKTDQWT	SNLDLLTGRL	KFADDEKLHA	EWAAAKLASK	KRLAKHVLDV	TGVTIDPNNL	FDIOIKRIHE	YKROLNMLG	AVRYKKLKE	MSAADR. KKV
PB2	SKWIGSDDWI	LNTDKLAGLK	KFADDEDLQS	EWRTAKRNK	MKVSLIRDK	TGYVSPDAM	FDVQVKRIHE	YKROLNMLG	IVRYKKMKE	MSAKDRIKSF
PK1	SKWIGSDDWI	LNTDKLAGLK	KFADDEDLQS	EWRTAKRNK	MKVSLIRDK	TGYVSPDAM	FDVQVKRIHE	YKROLNMLG	IVRYKKMKE	MSAKDRIKSF
PK2	SKWIGSDDWI	LNTDKLAGLK	KFADDEDLQS	EWRTAKRNK	MKVSLIRDK	TGYVSPDAM	FDVQVKRIHE	YKROLNMLG	IVRYKKMKE	MSAKDRIKSF
PB3	SKWIGSDDWI	LNTDKLAGLK	KFADDEDLQS	EWRTAKRNK	MKVSLIRDK	TGYVSPDAM	FDVQVKRIHE	YKROLNMLG	IVRYKKMKE	MSAKDRIKSF
	** * *	* * *	*****	** ** *	* * *	** *	** * *	*****	*****	*** *
	701									800
KV	TPRTRVMGGK	AFATYTNNAK	IVKLVNDVGA	VVNNDADVNK	YLKVVFIIPNY	NVSVAEVLIP	GSELSQHIST	AGMEASGTSN	MKFSLN	IGTLDGANVE
CK1	TPRTRVMGGK	AFATYTNNAK	IVKLVNDVGA	VVNNDADVNG	YLKVVFIIPNY	NVSVAEVLIP	GSELSQHIST	AGMEASGTSN	MKFSLN	IGTLDGANVE
PB2	VPRVCIFGGK	AFATYVQAKR	IVKFITDVAA	TVNYDPDIDG	LLKVVFPDY	NVSVAEKLIP	ASELSQHIST	AGMEASGTSN	MKFAMN	IGTLDGANVE
PK1	VPRVCIFGGK	AFATYVQAKR	IVKFITDVAA	TVNYDPDIDG	LLKVVFPDY	NVSVAEKLIP	ASELSQHIST	AGMEASGTSN	MKFAMN	IGTLDGANVE
PK2	VPRVCIFGGK	AFATYVQAKR	IVKFITDVAA	TVNYDPDIDG	LLKVVFPDY	NVSVAEKLIP	ASELSQHIST	AGMEASGTSN	MKFAMN	IGTLDGANVE
PB3	VPRVCIFGGK	AFATYVQAKR	IVKFITDVAA	TVNYDPDIDG	LLKVVFPDY	NVSVAEKLIP	ASELSQHIST	AGMEASGTSN	MKFAMN	IGTLDGANVE
	** * *	*****	***	***	*****	***	*****	*****	***	*****
	801									900
KV	IREEVGQDNF	FLFGAKADQV	AGLRKIDRENG	LFKPDPRFEE	AKQFIRSGAF	GTVDYTPLLD	SLEGNTGFGR	GDYFLVGVDY	PSYIDAQARV	DEAYDKKKKW
CK1	IREEVGQDNF	FLFGAKADQI	AGLRKEREDG	LFKPDPRFEE	AKQFIRSGAF	GTVDYTPLLD	SLEGNTGFGR	GDYFLVGVDY	PSYIDAQARV	DEAYDKKKKW
PB2	IREEVGEENF	FLFGAHAPEI	AGLRQERAEG	KFVPDPRFEE	VKEYVRSGVF	GTSNYDELMG	SLEGNEGYGR	ADYFLVGKDF	PSYIECQEKV	DEAYRDQKLW
PK1	IREEVGEENF	FLFGAHAPEI	AGLRQERAEG	KFVPDPRFEE	VKEYVRSGVF	GTSNYDELMG	SLEGNEGYGR	ADYFLVGKDF	PSYIECQEKV	DEAYRDQKLW
PK2	IREEVGEENF	FLFGAHAPEI	AGLRQERAEG	KFVPDPRFEE	VKEYVRSGVF	GTSNYDELMG	SLEGNEGYGR	ADYFLVGKDF	PSYIECQEKV	DEAYRDQKLW
PB3	IREEVGEENF	FLFGAHAPEI	AGLRQERAEG	KFVPDPRFEE	VKEYVRSGVF	GTSNYDELMG	SLEGNEGYGR	ADYFLVGKDF	PSYIECQEKV	DEAYRDQKLW
	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
	901									
KV	IKMSILNTAG	SGKFSSDRTI	DQYAKEIWGI	SACFVP *						
CK1	IKMSILNTAG	SGKFSSDRTI	DQYAKEIWGI	SACFVP *						
PB2	TRMSILNTAG	SPKFSSDRTI	HEYAKDIWDI	SPVIMP *						
PK1	TRMSILNTAG	SPKFSSDRTI	HEYAKDIWDI	SPVIMP *						
PK2	TRMSILNTAG	SPKFSSDRTI	HEYAKDIWDI	SPVIMP *						
PB3	TRMSILNTAG	SPKFSSDRTI	HEYAKDIWDI	SPVIMP *						
	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****

Abbildung 38: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen aller in Weizen identifizierten cDNA-Fragmente von Phosphorylasen.

KV = Aminosäuresequenz der cytosolischen Phosphorylase aus der Blatt-cDNA-Bank, **CK1** = der aus Korn-RNA amplifizierten cytosolischen Phosphorylase, **PB2** = der aus Blatt -RNA amplifizierten plastidischen Phosphorylase 2, **PB3** = der aus Korn -RNA amplifizierten plastidischen Phosphorylase 3, **PK1** = der aus Korn -RNA amplifizierten plastidischen Phosphorylase 1, **PK2** = der aus Korn -RNA amplifizierten plastidischen Phosphorylase 2. Die Insertsequenz der plastidischen Phosphorylasen ist fett gedruckt und unterstrichen, das Pyridoxalphosphat-Bindungsmotiv grau unterlegt und umrahmt. In allen vorhandenen Sequenzen gleiche Aminosäuren sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet, das potenzielle Startmethionin von KV ist fett gedruckt.

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Beck danke ich für die Überlassung des Themas, für seine Diskussionsbereitschaft und für rettende Ideen und Hilfe bei manchem Problem.

Herrn Dr. Paul Ziegler danke ich für die hervorragende und ausdauernde Betreuung, die gute Zusammenarbeit und für die Bereicherung meines Lebens durch blinde Mäuse.

Für die finanzielle Unterstützung möchte ich mich bei dem Graduiertenkolleg „Biosynthese der Proteine und Regulation ihrer Aktivität“ bedanken, das mir auch die Teilnahme an zahlreichen internationalen Tagungen ermöglichte. Weiterhin gebührt Dank der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung der letzten zwei Jahre im Rahmen des Projektes Zi-332/3-1.

Allen Mitgliedern und Professoren des Graduiertenkollegs danke ich für die vielen aufschlussreichen Seminare und für ihr Interesse an meinen Vorträgen.

Ein Dank an Dr. Sylvia de Pater, Leiden, Niederlande, für die freundliche Überlassung der cDNA-Bank aus Endosperm der Weizensorte Minaret. Ein weiterer Dank an Dr. Charles Ainsworth, London, England, für die Bereitstellung der Sonde für die zwei Untereinheiten der AGPase aus Weizen.

Alison Smith und Sam Zeeman vom John Innes-Center in Norwich, England danke ich für die Einladung zu meinem Gastaufenthalt im Februar 2001 und die Einblicke in die Welt der Phosphorylasen in *Arabidopsis*. Für die Gastfreundschaft und ihr Bemühen um mich danke ich Maggie Heath und Helen Jenner.

Bei Silke Hübsch möchte ich mich für ihre Geduld bei den vielen feinmotorisch anspruchsvollen Arbeiten im Labor, für ihren Kampf um jedes keimende Weizenkorn und für ihre Freundschaft in und ausserhalb unseres „blonden“ Labors bedanken.

Michelle Fountain danke ich für ihre Hilfe bei molekularbiologischen Problemen, die gute Zusammenarbeit zwischen unseren Labors, für einige Cocktailabende und noch mehr.

Für die angenehme Zusammenarbeit möchte ich mich bei meinen Laborkolleginnen Ilka Schindler, Gerlinde Wagner und Lenka Zemanová bedanken, ausserdem bei meinen Praktikantinnen Evi, Denise und Insa.

Ein Dankeschön an meine fleißigen und in der neuen Rechtschreibung bewanderten Korrekturleser Lenka, Maren, Michelle, Britt und Roland.

Ferner möchte ich mich bei allen Kollegen des Lehrstuhls Pflanzenphysiologie für die nette Atmosphäre bedanken. Besonderer Dank gilt Dr. Alfons Weig für meine Einarbeitung in die Molekularbiologie und in einige Computerfertigkeiten.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen meinen Freunden, die manchen Stress mit mir abgebaut haben, allen voran Pascale, Britta und Birgit. Ein besonderer Dank an Jens und Armin für die charmante Essensbegleitung.

Danke, Michel für den bewundernswert zuverlässigen Computer!

Ein grosses Danke auch an Xavier für seine Geduld mit mir und die fast regelmässige Verpflegung. Ein weiteres Danke an meine Katzen, dass sie nicht so oft auf der Tastatur oder der Maus lagen, wie ich es befürchtet hatte.

Mein grösster Dank gilt meinen Eltern für jegliche Unterstützung in diesen Jahren, besonders meiner Mutter, die immer an mich glaubt.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner bestätige ich, dass ich weder an der Universität Bayreuth noch anderweitig versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung abzulegen.

Bayreuth, den 09.04.2002

Nicole Schupp

